

**Funktionelle und strukturelle
Charakterisierung des
phage shock protein A aus
*Escherichia coli***

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften, Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Dipl.–Biol.

Hendrik Gerhard Osadnik

geboren am 06.03.1983

in Gelsenkirchen

2014

Referent: Prof. Dr. Thomas Brüser

Korreferent: Prof. Dr. Kürşad Turgay

Korreferent: Prof. Dr. Gary Sawers

Tag der Promotion: 15.08.2014

Kurzzusammenfassung

Das *Phage-shock*-System von *Escherichia coli* reagiert auf durch u.a. Sekretine oder starken Hitzeschock ausgelösten Zellstress und scheint unter diesen Bedingungen eine Rolle als Stress-Sensor und Stabilisator der Membran zu spielen. Trotz der zahlreichen Umstände, unter denen eine Induktion des Systems beobachtet werden konnte, liegt seine konkrete Funktion weiterhin im Dunkeln. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit PspA, dem zentralen Effektorprotein des Systems, und seiner regulativen Interaktion mit dem bakteriellen *Enhancer*-Protein PspF. PspF ist der Aktivator des σ^{54} -abhängig exprimierten *psp*-Systems und ein Mitglied der AAA+-ATPase-Familie. Beide Proteine bilden einen Komplex, in dem die Aktivität von PspF inhibiert wird, und bisherige Studien deuten darauf hin, dass die Aktivierung von PspF unter Stressbedingungen durch Dissoziation von PspA erfolgt. Während die Interaktion der beiden Proteine zu einem inhibierenden Komplex bereits beschrieben wurde, existiert keine mechanistische Vorstellung darüber, wie diese Regulation durch PspA molekular realisiert ist. In dieser Arbeit konnte die PspF-Bindedomäne von PspA identifiziert und ihre Struktur bestimmt werden. Darüber hinaus wurden die für die PspF-Bindung verantwortlichen Regionen von PspA identifiziert, und ihre Wirkung auf PspF im inhibitorischen Komplex der beiden Proteine *in vivo* und *in vitro* mittels verschiedener Methoden charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, dass die regulative Interaktion von PspA und PspF komplexer ist, als gemeinhin angenommen, und führen zu einer Neuinterpretation der Rolle, die PspA im PspA-PspF-Komplex spielt. Überraschenderweise zeigte sich, dass dieser Komplex strukturell sowie in seinen regulatorischen Eigenschaften stark einer anderen Gruppe der AAA+-Proteine ähnelt, den ClpB-Disaggregasen. Dies deutet darauf hin, dass diese beiden AAA+-ATPasen trotz vollkommen verschiedener Funktionen über einen ähnlichen Mechanismus reguliert werden.

Abstract

The phage shock system (*psp* system) is a stress responsive system of *E. coli* thought to be involved in membrane stress sensing and membrane stabilization. Although the *psp* system is found to be induced in a multitude of situations, e.g. secretin stress and severe heat shock, its functions remain obscure. This work mainly focusses on the pivotal effector protein of the system, PspA, and its regulatory interaction with the bacterial enhancer binding protein PspF, an AAA+-ATPase and the activator of the *psp* system. PspA and PspF form a regulatory complex to inhibit σ^{54} -dependent *psp* expression, activation of the system is thought to involve dissociation of PspA from PspF. While the interaction of these two proteins has been described before, the mechanism by which PspA regulates PspF is still unknown.

This work presents the identification and structure determination of the PspF-binding domain of PspA. Furthermore, the regions of PspA responsible for PspF-binding and regulation were characterized *in vivo* and *in vitro* and their effect on the regulatory complex of PspA and PspF was assessed from several experimental perspectives. The results indicate that the regulatory interaction of PspA and PspF is more complex than previously thought and lead to a re-interpretation of the role of PspA in the PspA-PspF complex. Surprisingly, its structural and functional characteristics strongly resemble the regulatory mechanism of another group of AAA+-proteins, ClpB-disaggregases, suggesting that these AAA+-ATPases with divergent cellular functions are regulated via a similar mechanism.

Schlagworte

bakterielle Stressantwort, *psp*-System, PspA

Keywords

bacterial stress response, *psp* system, PspA

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	<i>Phage shock protein A</i> und das <i>psp</i> -System	9
1.2	Die PspA/IM30-Familie	10
1.3	Die Psp-Antwort — auf der Suche nach einer Funktion	13
1.4	Die Psp-Proteine und ihr Verhalten während der Psp-Antwort	16
1.5	Die Aktivierung des <i>psp</i> -Systems durch PspF und die Rolle von PspA	19
1.6	Zielsetzung	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Molekularbiologische Methoden	25
2.1.1	Stämme	25
2.1.2	Plasmide und Klonierungen	26
2.2	Zellanzucht und Proteinreinigungen für <i>In-vitro</i> -Studien	37
2.2.1	Biochemische Analysen und Assays	40
2.2.2	<i>In-silico</i> -Arbeiten	45
3	Ergebnisse	49
3.1	PspA ₁₋₁₄₄ : Struktur und funktionelle Bereiche der PspF-inhibierenden PspA-Domäne	49
3.1.1	Identifikation der PspF-inhibierenden Domäne von PspA <i>in vivo</i>	49
3.1.2	PspA ₁₋₁₄₄ ist ein <i>Coiled-coil</i> -Protein mit konservierter Architektur	55
3.1.3	<i>In-vivo</i> -Identifikation der PspF-Binderegion 1 (FBR1) auf CC1	62
3.1.4	Eine zweite PspF-Binderegion (FBR2) reguliert die PspA-Aktivität	67
3.1.5	Aminosäuren in der <i>Tip</i> -Region beeinflussen die PspF-Regulation leicht	69

3.2	Der PspA·F-Komplex: PspA ₁₋₁₄₄ stabilisiert PspF-Hexamere und moduliert ihre ATPase-Aktivität	74
3.2.1	Reinigung der Proteine für <i>In-vitro</i> -Studien	74
3.2.2	PspA ₁₋₁₄₄ und PspF ₁₋₂₆₅ bilden einen SEC-stabilen Komplex	76
3.2.3	Die AUC zeigt die stabilisierende Funktion von PspA im PspA·F-Komplex	80
3.2.4	PspA ₁₋₁₄₄ ist ein Modulator der PspF-ATPase im gesättigten PspA·F-Komplex	87
3.2.5	PspA ^{E37A} ist ein Aktivator der PspF-Variante PspF ^{W56A}	93
3.2.6	ClpB als Vorlage für den PspA·F-Komplex	97
3.3	Die mögliche Oligomerisierungsdomäne PspA ₁₆₀₋₂₂₂	103
3.3.1	<i>In-silico</i> -Analysen zu CC3/CTR	103
3.3.2	C-terminale PspA-Fragmente	106
3.3.3	PspA ₁₆₀₋₂₂₂ -Modifikationen	109
3.4	Das Yjf-System von <i>E. coli</i>	115
3.4.1	YjfJ ist ein PspF-interagierendes PspA-Homolog von <i>E. coli</i>	115
3.4.2	YjfI-YjfJ-Interaktion	117
4	Diskussion	121
4.1	PspA ₁₋₁₄₄ und der PspA·F-Komplex – ein neues Modell der <i>psp</i> -Regulation	121
4.1.1	PspA·F und ClpB — konvergente Evolution	123
4.1.2	Die Modulation der PspF-Aktivität – ein Paradigmenwechsel?	129
4.1.3	Ein aktiver PspA·F-Komplex im Kontext des aktuellen Psp-Modells	138
4.2	PspA-Oligomerisierung	143
4.3	Quo vadis, PspA?	151
	Literaturverzeichnis	155

1 Einleitung

1.1 *Phage shock protein A* und das *psp*-System

Das *phage shock protein A* (PspA) wurde vor knapp 25 Jahren während der Infektion des γ -Proteobakteriums *Escherichia coli* mit dem filamentösen Phagen f1 identifiziert, da es unter diesen Bedingungen stark in der Zelle akkumulierte (Brissette *et al.*, 1990). Als Grund für diese starke Produktion von PspA konnte die Synthese des Sekretins pIV bestimmt werden, eines in der äußeren Membran Poren zur Phagensekretion bildenden Proteins. Dieses Sekretin lokalisierte bei starker Produktion auch in die Cytoplasmamembran und führte so zur Induktion der *pspA*-Expression. Da PspA zu gleichen Teilen peripher mit der Cytoplasmamembran interagierend und cytoplasmatisch vorlag, wurde eine Rolle von PspA als Stressprotein im Kontext von Membranstress postuliert. Neben der Induktion durch das pIV-Sekretin konnten dazu auch Ethanol, starker Hitzestress sowie hyperosmotischer Schock als Induktionsbedingungen für *pspA* beobachtet werden. PspA ist ein etwa 26 kDa großes Protein, dessen Sekundärstruktur zum Großteil als *coiled coil* vorhergesagt ist (Brissette *et al.*, 1991). Das für PspA codierende *pspA* bildet mit den Genen *pspBCDE* ein Operon, dessen Expression vom alternativen Sigmafaktor σ^{54} reguliert wird (Weiner *et al.*, 1991). Die Induktion der σ^{54} -abhängigen Genexpression benötigt die ATP-abhängige Aktivierung durch ein *bacterial enhancer binding protein* (bEBP; Popham *et al.*, 1989). Hier konnte PspF als spezifischer Aktivator des *pspA*-Operons identifiziert werden (Weiner *et al.*, 1995; Jovanovic *et al.*, 1996), dessen Gen im 5'-Bereich auf dem Gegenstrang zu *pspA* codiert und σ^{70} -abhängig konstituitiv exprimiert wird (Abb. 1; Jovanovic *et al.*, 1997). Darüber hinaus konnte mit *pspG* ein weiteres unter der Kontrolle von σ^{54} /PspF stehendes Gen identifiziert werden (Lloyd *et al.*, 2004), sodass das PspF-Regulon insgesamt sechs Gene umfasst. Drei der Genprodukte, PspA, PspB und PspC, bilden zusammen mit PspF das minimale *psp*-System.

Bereits mit der Sequenzierung von *pspF* wurde bemerkt, dass PspF im Gegensatz

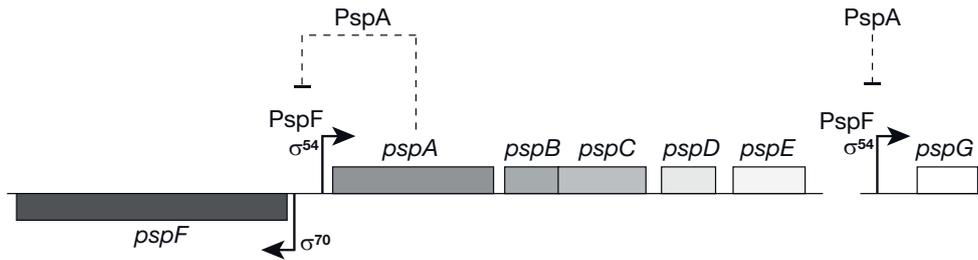


Abbildung 1 Das *psp*-Regulon von *Escherichia coli*. Das Regulon besteht aus sieben Genen, 5 davon sind im *pspA*-Operon organisiert. PspF wird σ^{70} -abhängig produziert und ist der Aktivator der σ^{54} -abhängigen Expression von *pspABCDE* sowie *pspG*. PspA wirkt als Inhibitor auf PspF und reguliert das *psp*-Regulon somit in einem negativen Feedback-Loop.

zu anderen bEBPs keine *cis*-agierende N-terminale Regulatordomäne besitzt, die die Aktivität des Proteins inhibieren könnte (Jovanovic *et al.*, 1996). Es konnte im Folgenden gezeigt werden, dass PspA diese Rolle einer regulatorischen Domäne übernimmt und somit durch Bindung die Regulation der PspF-Aktivität in *trans* realisiert (Dworkin *et al.*, 2000). Das PspF-Regulon wird demnach über einen negativen Feedback-Loop von PspA und PspF kontrolliert. Als weitere Interaktionspartner von PspA konnten die beiden kleinen Membranproteine PspB und PspC identifiziert werden (Adams *et al.*, 2003), für die aufgrund ihrer bereits zuvor beobachteten Fähigkeit zur Induktion der *psp*-Expression bei Sekretinstress (Weiner *et al.*, 1991) eine Rolle als Membranstress-Sensoren postuliert wurde. Die weiteren im PspF-Regulon kontrollierten Gene *pspDEG* spielen eine unklare, wohl aber nicht entscheidende Rolle innerhalb des *psp*-Systems. PspD ist ein peripheres Membranprotein (Adams *et al.*, 2003), PspE eine periplasmatische Rhodanase (Sulfurtransferase; Adams *et al.*, 2002) und PspG ein kleines Membranprotein (Lloyd *et al.*, 2004).

1.2 Die PspA/IM30-Familie

Nach der Entdeckung des *psp*-Systems in *E. coli* konnten PspA-homologe Proteine (zusammengefasst in der PspA/IM30-Familie; IM30 steht für *30 kDa inner membrane protein*) in vielen weiteren Organismen aller drei Domänen des Lebens identifiziert werden. Unter ihnen sind LiaH *Bacillus subtilis*, welches durch das

LiaRS-Zweikomponentensystem reguliert wird (Mascher *et al.*, 2004), ein unter verschiedenen Stressbedingungen induziertes Homolog in *Streptomyces lividans* (Vrancken *et al.*, 2008) und ein bei Salzstress produziertes PspA aus dem Archaeon *Haloferax volcanii* (Bidle *et al.*, 2008). Weiterhin konnte ein um eine kurze C-terminale Sequenz verlängertes 30 kDa schweres Homolog, VIPP1 (*vesicle-inducing plastid protein 1*) in den Chloroplasten von *Pisum sativum* (Li *et al.*, 1994) sowie in *Chlamydomonas reinhardtii* (Liu *et al.*, 2005) identifiziert werden, welches essentiell für die Biogenese der Thylakoidmembranen ist (S. Westphal *et al.*, 2001). Mitglieder der PspA-Familie gehören dabei zu den Proteinen mit dem höchsten relativen *Coiled-coil*-Anteil in den jeweiligen Organismen (Rose *et al.*, 2005). Die genomische Einbettung von *pspA* in das *psp*-System (mit *pspF*, *pspB* und *pspC*) ist nur in γ -Proteobacteria deutlich konserviert. Insbesondere außerhalb der Proteobacteria, wo nur in wenigen Fällen PspF-homologe Regulatoren identifiziert werden konnten (Francke *et al.*, 2011), sind *pspA*-homologe Gene in verschiedenem genetischen Kontext organisiert.

Eine interessante, aber bisher weitgehend unbeachtete Tatsache ist der Umstand, dass etliche Organismen mehrere *pspA*-Homologe in ihrem Genom besitzen (Abb. 2, Osadnik, 2009), Cyanobacteria wie *Synechocystis sp.* beispielsweise sowohl VIPP1 als auch PspA (S. Westphal *et al.*, 2001). Zu den Organismen mit mehreren *psp*-Kopien gehört auch *E. coli*, auf dessen Chromosom sich zusätzlich zu *pspA* das *pspA*-homologe *yjfJ* findet. *YjfJ* wurde bereits als PA3731 in *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (Macé *et al.*, 2008) und ist dort Teil des *bac*-Clusters (*biofilm-associated cluster*) mit einer möglichen Funktion in der Biofilm-Bildung. Das in *P. aeruginosa* im 5'-Bereich vor *yjfJ* liegende *yjfI* existiert ebenfalls in *E. coli*, und darüber hinaus im gleichen genomischen Kontext mit *yjfJ*, sodass anzunehmen ist, dass YjfI und YjfJ ein funktional konserviertes System bilden, das Yjf-System. Psp- und Yjf-Systeme kommen in einigen Organismen (wie *E. coli*) gemeinsam vor, u.a. in *P. aeruginosa* wie auch *Xanthomonas*-Spezies existiert hingegen nur das Yjf-System, und in Proteobacteria der Gattungen *Yersinia* und *Vibrio* findet sich nur das kanonische *psp*-System (Abb. 2, Mitte).

1 Einleitung



Abbildung 2 *PspA* und seine Homologe sind weit verbreitet und existieren gleichzeitig in Organismen. Die drei PspA/IM30-Gene *pspA*, *yjfJ* und *VIPP1* sind in ihrem jeweiligen genetischen Kontext in verschiedenen Organismen gezeigt, wenn es hier sich hierbei um konservierte Gene handelt. Gleiche Einfärbung zeigt homologe Gene an. Die Genbezeichnungen aus *E. coli* sind oben angegeben, im Falle der Existenz mehrerer ähnlicher Homologe in einem Organismus sind die entsprechenden UniProt-Identifikationsnummern zur Orientierung ebenfalls angegeben.

Während das Vorhandensein von zwei Psp-artigen Systemen häufiger zu beobachten ist, gibt es in extremen Fällen mehrere Homologe von Psp- und Yjf-Systemen in einem Organismus: *Hahella chejuensis* vereint ein vollständiges *psp*-System, zwei Yjf-Systeme sowie ein isoliertes *pspA*-Homologon in seinem Genom, jedoch konnte in diesem und keinem anderen Organismus mehr als ein *pspF* im Genom identifiziert werden. Während man für Cyanobacteria wie *Synechocystis sp.* eine mögliche Erklärung der Existenz zweier PspA-Homologe darin sehen kann, dass sie zwei verschiedene Membransysteme zur PspA-Interaktion besitzen, ist der Grund für die Existenz mehrerer *psp*-Systeme in den anderen Organismen vollkommen unklar, was unter anderem auch mit der ungeklärten Funktion des *psp*-Systems zusammenhängt.

1.3 Die Psp-Antwort — auf der Suche nach einer Funktion

Obwohl alle Proteine des *psp*-Systems in *E. coli* seit längerem bekannt sind, und ihre Interaktionen und Lokalisationen in der Zelle grundlegend charakterisiert wurden, liegt die physiologische Funktion des *psp*-Systems weiter im Dunkeln. Dabei sind Bedingungen, unter denen das *psp*-System induziert wird, vielfach charakterisiert worden: Eindeutig gezeigt wurde die Induktion in *E. coli* bei pIV-Sekretinproduktion, bei starkem Hitzestress oder Zugabe von 10% (v/v) Ethanol (Brissette *et al.*, 1990), bei Zugabe des Protonophors CCCP (Weiner und Model, 1994), hyperosmotischem Schock mit 0,4 M NaCl (Weber *et al.*, 2006) oder durch den Einfluss antimikrobieller Peptide (Fränzel *et al.*, 2012). Ebenfalls zu einer stärkeren Produktion der Psp-Proteine kommt es in Biofilmen (Beloin *et al.*, 2004), während einer Phageninfektion (Poranen *et al.*, 2006), dem Eintritt in die stationäre Phase (Weiner und Model, 1994) oder dem Wachstum auf Blattoberflächen (Fink *et al.*, 2012). In einem zweiten Modellorganismus der Psp-Forschung, *Yersinia enterocolitica*, konnte gleichfalls eine massive Induktion u.a. durch Sekretinproduktion nachgewiesen werden (Maxson und Darwin, 2004). Auch einige

1 Einleitung

Gendeletionen bzw. Proteindepletionen führen zur *psp*-Induktion, unter anderem die Deletion von *tolC* (Dhamdhare und Zgurskaya, 2010), *tatC* (Ize *et al.*, 2004) oder die Depletion von YidC (van der Laan *et al.*, 2003) in *E. coli*. Die Deletion von *pspBC* hat einen negativen Einfluss auf die Indol-Induzierte Bildung von *Persister*-Zellen (Vega *et al.*, 2012).

Als mögliches Stress-Signal für die Induktion des *psp*-Systems wurde schon früh die Schwächung der Integrität der Cytoplasmamembran postuliert (Brissette *et al.*, 1991), insbesondere auch aufgrund der peripheren Bindung von PspA an die Membran, sowie der Lokalisation des pIV-Sekretins in selbige. PspA sollte daher eine Funktion als Stabilisator der Membran übernehmen. Dies konnte einmalig *in vitro* mit gereinigtem PspA und Membranvesikeln gezeigt werden (Kobayashi *et al.*, 2007). Kleerebezem *et al.* (1996) zeigten, dass der Protonengradient über der Cytoplasmamembran (*proton motive force*, PMF) in einem *psp*-deletierten Stamm unter Sekretionsstress geschwächt ist, was die Hypothese einer Stabilisierung der Membran durch PspA bestätigte. Gleiches konnte für die Produktion des PulD-Sekretins beobachtet werden (Guilvout *et al.*, 2006), sodass die Schwächung der PMF als zentrales Signal für die *psp*-Induktion angenommen wurde. Es schien wahrscheinlich, dass dieses Signal über PspC detektiert wird, da PspC in vielen Fällen notwendig ist, um eine Induktion des *psp*-Systems unter Stress beobachten zu können. Dies gilt insbesondere für Sekretine (Darwin und V. L. Miller, 2001). Als Bestätigung der Membranstabilisations-Hypothese konnte weiterhin gezeigt werden, dass PspA in der Lage ist, größere homo-oligomere Strukturen mit einer netzwerkartigen Feinstruktur zu bilden (Standar *et al.*, 2008, diese schienen nach Detergenzbehandlung und *Singe-particle*-Analyse ringförmig zu sein; Hankamer *et al.*, 2004), sodass diese Strukturen die mögliche aktive Effektor-Form von PspA darstellen.

Als möglicher Sensor, der das Signal an PspC weiterleitet, wurde ArcB, die membranständige Sensorkinase des ArcAB-Systems postuliert. Ihre Autophosphorylierung hängt von dem Oxidationszustand der Chinone, und damit indirekt vom

Membranpotential ab (Malpica *et al.*, 2006). Die ArcB-Abhängigkeit konnte jedoch nicht zweifelsfrei gezeigt werden: Während in einer ersten Studie ein Einfluss einer *arcB*-Deletion auf die *psp*-Expression gezeigt wurde (Jovanovic *et al.*, 2006), widersprach dem eine weitere Studie, die zeigte, dass für die Sekretin-abhängige Induktion des *psp*-Systems ArcB prinzipiell nicht notwendig ist (Seo *et al.*, 2007). Es deutete sich im Folgenden an, dass eine ArcB-Abhängigkeit möglicherweise konditional und nur unter microaeroben Bedingungen von Bedeutung ist (Jovanovic *et al.*, 2009). Weiterhin konnte keine *psp*-Induktion durch Schwächung der PMF mit Valinomycin oder Acetat beobachtet, und darüber hinaus auch eine Unabhängigkeit der *psp*-Regulation vom Oxidationszustand der Chinone gezeigt werden, sodass mittlerweile davon ausgegangen wird, dass die PMF nicht das Signal für die Induktion des *psp*-Systems darstellt, und es in der Lage ist, multiple und teils unidentifizierte Signale zu integrieren (Engl *et al.*, 2011). Somit ist bis heute kein eindeutiges Signal für die Induktion des *psp*-Systems bekannt.

Die Identifikation der Funktion des *psp*-System wird weiterhin durch die Tatsache erschwert, dass die Induktion des *psp*-Systems augenscheinlich nicht mit der Schwere des Membranstresses korreliert. Brissette *et al.* (1990) konnten bereits beobachten, dass die Produktion des pIV-Sekretins keine Auswirkungen auf das Wachstum von *E. coli* hatte, in *Y. enterocolitica* hingegen wirken Sekretine in Stämmen ohne *psp*-Gene bei Überproduktion teilweise toxisch (Darwin und V. L. Miller, 2001). Jedoch waren die stärksten *psp*-Induktoren, die in einem *screening* in *Y. enterocolitica* identifiziert werden konnten keine Sekretine, und hatten keinen Einfluss auf die Membranstabilität, sodass der Grund für ihre stark induzierende Wirkung vollkommen unklar ist (Maxson und Darwin, 2004).¹ In ähnlichen Versuchen mit Varianten von pIV in *E. coli* waren gerade die am schwersten membranschädigend wirkenden nicht jene, die *psp* am stärksten induzierten (Spagnuolo *et al.*, 2010).

Die physiologische Rolle des *psp*-Systems ist damit weiterhin unklar, da die direkte

¹Im Falle des stark induzierenden Membranproteins YE0566 hat eine Überproduktion sogar einen negativen Effekt auf das Wachstum des WT-Stammes, nicht aber auf das eines $\Delta psps$ -Stammes (Horstman und Darwin, 2012).

Korrelation von Stress, Signal, und Psp-Funktion bisher nicht gelingen konnte. Ein funktioneller Zusammenhang mit der Cytoplasmamembran und Membranstress scheint wahrscheinlich, da die starken Induktoren zum Großteil Membranproteine sind, und viele der anderen Induktoren einen Einfluss auf die Stabilität der Membran haben. In den letzten Jahren wurde daher verstärkt versucht, die Interaktionen der Psp-Proteine untereinander und mit der Membran aufzuklären, um über diesen Weg die Rolle des *psp*-Systems charakterisieren zu können.

1.4 Die Psp-Proteine und ihr Verhalten während der Psp-Antwort

Das aktuelle Modell des *psp*-Systems und seiner Reaktion auf induzierende Bedingungen geht mit wenigen Modifikationen auf Hankamer *et al.* (2004) zurück, und basiert in der hier gezeigten Form auf dem Konsens der u.a. in Yamaguchi *et al.* (2010), Mehta *et al.* (2013) und Yamaguchi *et al.* (2013) beschriebenen Modellvorstellungen. Diese und andere neuere Studien konkretisieren das Modell des *psp*-Systems und dabei insbesondere der räumlichen Verteilung der Komponenten in der Zelle auf Basis Fluoreszenzprotein-fusionierter Psp-Proteine (Engl *et al.*, 2009; Lenn *et al.*, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2013).

Dem Modell folgend basiert die Induktion des *psp*-Systems vornehmlich auf einer Umverteilung von PspA zwischen PspF und PspB·C (Abb. 3). Wie bereits erwähnt sind PspB und PspC zwei miteinander und mit PspA interagierende, kleine Membranproteine (Adams *et al.*, 2003). Sie sind maßgeblich an der Reaktion des *psp*-Systems auf Sekretinstress beteiligt (Weiner *et al.*, 1991; Darwin und V. L. Miller, 2001), weswegen ihnen eine zentrale Rolle als Membranstress-Sensoren des *psp*-Systems zugesprochen wird, die sie vermutlich als Heterodimer ausüben (PspB·C). Unter nicht-induzierenden Bedingungen liegen sie, wie aus Versuchen mit GFP-fusionierten Proteinen hervorging, mobil in der Cytoplasmamembran vor und überprüfen möglicherweise über einen nicht näher charakterisierten Mechanismus den Zustand der Membran (Abb. 3a; Yamaguchi *et al.*, 2013). Währenddessen

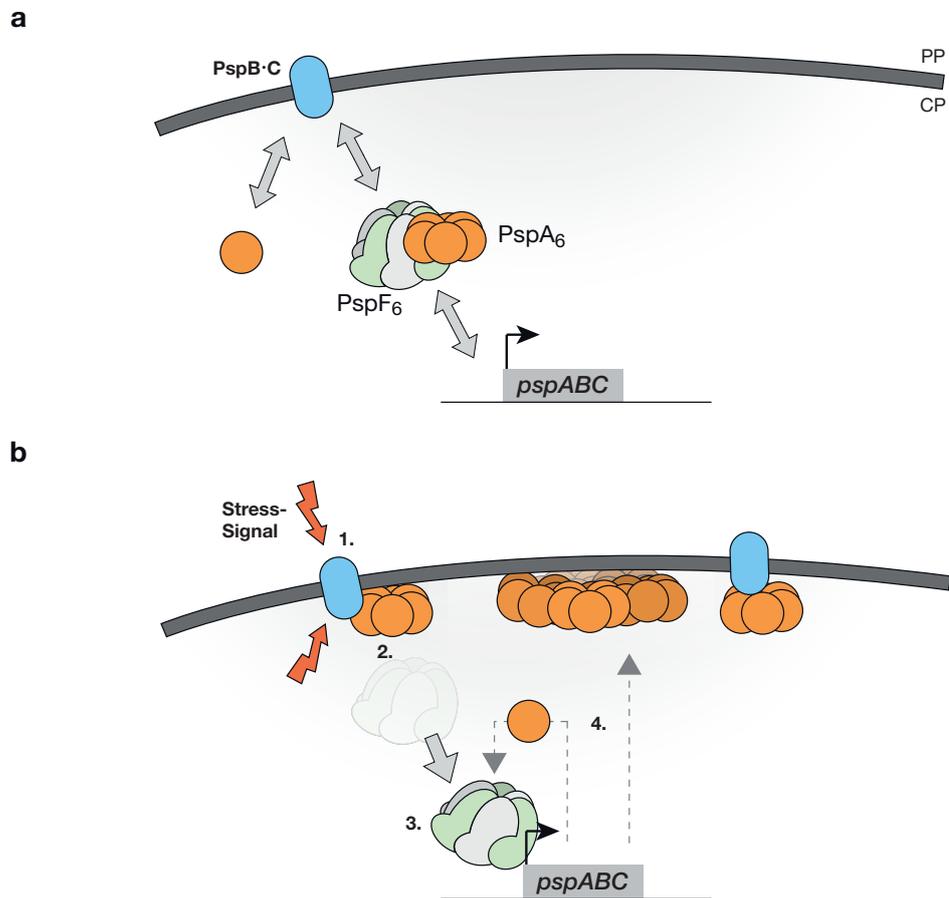


Abbildung 3 Das Modell der Psp-Antwort. (a) Im uninduzierten Zustand ist PspF (grün/grau) von PspA (orange) inhibiert und kann die Membran bzw. den putativen Membranstress-Sensor PspB·C (hellblau) und den *pspA*-Promotor kontaktieren, eventuell über PspA, welches in ungebundener Form ebenfalls mit PspB·C und der Membran interagiert. (b) **1.** Die Detektion eines unbekanntes Membranstress-Signals (*Blitz*) durch PspB·C führt **2.** zur festen Bindung von PspA an den Sensor, wodurch weniger PspA zur PspF-Inhibition zur Verfügung steht, sodass **3.** PspF die Psp-Antwort induzieren kann. **4.** Das neu gebildete PspA bindet dann direkt oder über PspB·C an Membranen und stabilisiert sie über einen unbekanntes Mechanismus. Gleichzeitig bindet es PspF und stellt somit die Inhibition des *psp*-Systems wieder her. Weitere Details siehe Haupttext.

1 Einleitung

wird PspF durch PspA gebunden, und damit in seiner Funktion als EBP inhibiert (Yamaguchi *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2013). Es liegt dabei in PspA-gebundener Form als Hexamer am Nukleoid und transient an der Membran bzw. PspB·C-kontaktierend vor (Mehta *et al.*, 2013). In einer anderen Studie konnte allerdings keine Nukleoid-Interaktion erkannt werden (Yamaguchi *et al.*, 2013). GFP-PspA liegt nach statistischer Auswertung von *single molecule photobleaching* überwiegend in hexamerer Form in der Zelle vor (Lenn *et al.*, 2011), sodass der inhibierende Komplex von PspA und PspF aus einem PspF-Hexamer und einem PspA-Hexamer besteht, welcher sich zwischen *psp*-Promotor und der Membran bzw. PspB·C bewegen kann, um möglicherweise des Zustand von PspB·C oder der Membran zu messen (Mehta *et al.*, 2013).

Unter Sekretinstress-Bedingungen konnte eine deutliche Veränderung der Lokalisation der Psp-Komponenten beobachtet werden, einhergehend mit der Induktion des *psp*-Systems (Abb. 3b). Die Induktion geschieht nach diesem Modell über das Lösen von PspF aus der inhibierenden Bindung zu PspA, der daraus resultierende Ablauf der Psp-Antwort lässt sich dabei in mehrere Schritte einteilen: PspB·C messen zu Beginn der Kaskade ein bisher uncharakterisiertes Signal, welches durch die Produktion von Sekretin ausgelöst wird (Abb. 3b, 1.). Dies führt dazu, dass sich PspA verstärkt an PspB·C anlagert (2.). Dadurch wird PspF frei (3., wahrscheinlich über eine einfache Titration durch die Bildung von PspA·B·C; Yamaguchi *et al.*, 2013; Jovanovic *et al.*, 2014) und kann die σ^{54} -abhängige Expression des *pspA*-Operons aktivieren. Daraufhin wird PspA in großen Mengen gebildet und kann an ebenfalls neu gebildetes PspB·C bzw. direkt an die Membran binden (Yamaguchi *et al.*, 2010). Dies geschieht vermutlich in den für PspA beschriebenen oligomeren Komplexen (4. (Standar *et al.*, 2008; Hankamer *et al.*, 2004)), wodurch aufgrund eines bisher nicht charakterisierten Mechanismus die Membran stabilisiert wird. Dabei führt die Bildung von PspA im Überschuss zu einer erneuten Bindung von PspF, und damit zur Inhibition des *psp*-Systems, wodurch es in den uninduzierten Zustand zurückkehrt.

Die in diesem Modell postulierte Verschiebung des Gleichgewichts von einem PspA·F-Komplex zu einem PspA·B·C-Komplex konnte als Reaktion auf Sekre-

tinstress mittels GFP-Fusionen gezeigt werden (Yamaguchi *et al.*, 2013). Dort co-lokalisierten PspA, PspB und PspC primär in großen polaren Foci ohne PspF, ebenso konnten vereinzelte kleine laterale Foci beobachtet werden. Versuche mit FLASH-Tag fusioniertem PspA konnten ebenfalls eine Veränderung der bevorzugten Interaktionspartner von PspA von PspF hin zu PspB·C zeigen, insbesondere auch in Versuchen, in denen die Produktion der Psp-Proteine konstant gehalten wurde, sodass die Veränderung der Interaktionspartner nicht ausschließlich eine Folge der Induktion des *psp*-Systems darstellen kann (Yamaguchi *et al.*, 2013). In ähnlichen Untersuchungen mit GFP-PspA (Engl *et al.*, 2009; Jovanovic *et al.*, 2014) konnten ebenfalls sowohl die lateralen als auch die polaren Foci beobachtet werden. Hier divergieren die Interpretation darüber, welche der Foci einen Sensor-Komplex und welche Effektor-Komplexe darstellen (Engl *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2013).

In jedem Falle wird aber deutlich, dass die Regulation der PspF-Aktivität den zentralen Punkt der *psp*-Regulation darstellt, und dass der Induktionszustand des *psp*-Systems ausschließlich über die regulative Interaktion von PspA und PspF kontrolliert wird, da PspB·C nach dem momentanen Modell die Induktion des Systems nur indirekt über die Bindung freien PspAs realisieren. Darüber hinaus gibt es — wie weiter oben erläutert — einige Induktionsbedingungen, die nicht PspB·C-abhängig zu sein scheinen, in jedem Fall aber über PspF zur Induktion des *psp*-Systems führen müssen. Ein molekulares Verständnis der PspA-PspF-Interaktion ist demnach von größter Bedeutung für eine akkurate Beschreibung der Regulation des *psp*-Systems.

1.5 Die Aktivierung des *psp*-Systems durch PspF und die Rolle von PspA

PspF ist ein in aktiver Form hexameres Protein und gehört, wie bereits einleitend erwähnt, zu den *bacterial Enhancer-Binding Proteins* (bEBP), die für die σ^{54} -abhängige Transkriptionsinitiation in Bakterien benötigt werden (Popham

1 Einleitung

et al., 1989). bEBPs besitzen eine ATPase-Aktivität und gehören ihrerseits zu der großen Familie der AAA+-Proteine (*ATPases associated with a variety of cellular activities*; Neuwald *et al.*, 1999). Die Mitglieder dieser funktionell diversen Familie sind oligomere Proteine (häufig ringförmige Hexa- oder Heptamere) und erfüllen beispielsweise Aufgaben in der DNA-Replikation (DnaA), als Motorproteine (Dynein), in der Protein-Disaggregation (ClpB), Proteolyse (FtsH) und, wie PspF, in der Transkriptions-Regulation (Ogura und Wilkinson, 2001). Sie alle zeichnet dabei das Vorhandensein einer konservierten AAA+-Domäne aus, in der zwei hochkonservierte Sequenzen (Walker A und Walker B; Walker *et al.*, 1982) für die ATP-Bindung und Hydrolyse verantwortlich sind.

In bEBP ist die ATP-Hydrolyse an die Aktivierung der Transkriptionsinitiation durch das σ^{54} -RNA-Polymerase-Holoenzym (σ^{54} -RNAP) gekoppelt (Schumacher *et al.*, 2004), welche — insbesondere auch durch Arbeiten mit PspF — im Detail charakterisiert werden konnte (Abb. 4). Die Struktur von PspF ist bekannt, und cryo-EM-Daten zu seiner σ^{54} -Interaktion liegen ebenfalls vor (Rappas *et al.*, 2005; Rappas *et al.*, 2006). Im nicht-aktivierten Zustand bindet σ^{54} mit seiner DNA-Binderegion (Region III) an konservierte σ^{54} -Bindestellen im Promoterbereich der regulierten Gene (-24 und -12 bp vor Transkriptionsstart; Wang *et al.*, 1999), ohne jedoch die Transkription zu initiieren, es bildet sich ein RNAP·DNA-Komplex (*closed complex*, RP_C). PspF bindet nun mittels einer DNA-Bindedomäne im C-terminalen Bereich des Proteins an eine im 5'-Bereich des Promoters lokalisierte *Enhancer*-spezifische Bindestelle an der DNA (UAS, *upstream activating sequence*). Mittels einer von IHF (*integration host factor*) verursachten DNA-Biegung (Schröder *et al.*, 1993) gelangt der N-terminale Bereich von PspF in Kontakt mit σ^{54} (Abb. 4a, links), wo er mittels einer flexiblen Loop-Region (dem GAFTGA-Motiv von Loop 1; Bordes *et al.*, 2003) mit der *Enhancer*-Bindedomäne des bEBPs interagiert (der Region I; Abb. 4a, Detailansicht rechts). Hierbei interagieren die Loop-1-Regionen mehrerer PspF-Protomere mit σ^{54} (Zhang *et al.*, 2012) und führen dabei zu leichten strukturellen Änderungen des Sigma-Faktors (Sharma *et al.*, 2014).

Im aktivierenden Zustand (Abb. 4b) vollzieht der PspF-Ring unter ATP-Hydrolyse

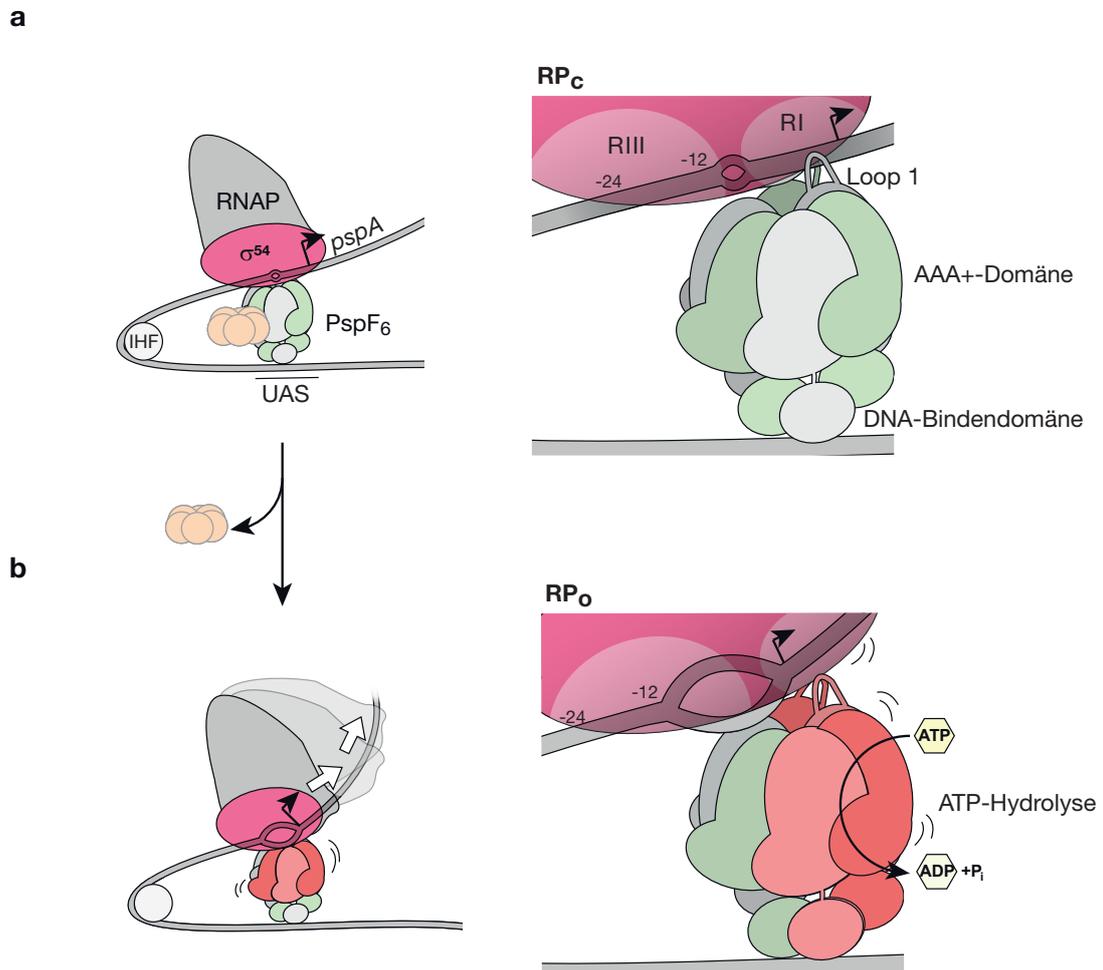


Abbildung 4 Modell der Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Transkriptionsinitiation durch PspF. (a) Im uninduzierten Zustand bindet PspF (*Protomere alternierend in grün/grau*) mit seiner DNA-Bindedomäne (siehe Detailansicht rechts) an die *upstream-activating sequence* (UAS) auf der DNA, und mit dem GAFTGA-Motiv von Loop 1 an die *Enhancer*-Binderegion (RI) der über Region III (R III) promotergebundenen σ^{54} -RNA-Polymerase (pink/grau), unterstützt durch DNA-Biegung des *Integration Host Factors* (IHF). Die PspF-ATPase ist hierbei durch PspA (in orange angedeutet) inhibiert, und σ^{54} -RNAP liegt in einem Komplex mit nur schwach geöffnetem DNA-Doppelstrang vor (*closed complex*, RP_C). (b) Bei Dissoziation von PspA wird die PspF-ATPase aktiv, und induziert über eigene Konformationsänderungen durch die ATP-Hydrolyse Strukturveränderungen in σ^{54} , wodurch die DNA weiter geöffnet wird und der transkriptionsinitiiierende *open complex* (RP_O) gebildet wird.

1 Einleitung

eine Konformationsänderung (Joly und Buck, 2011), die im bEBP NtrC mit der Bildung einer asymmetrischen Anordnung der L1-Loops einhergeht (Sysoeva *et al.*, 2013). Diese strukturelle Veränderung wird auf σ^{54} übertragen, dessen PspF-gebundene Region I damit näher an den Transkriptionsstart positioniert wird, wobei gleichzeitig die beiden DNA-Stränge weiter geöffnet werden (RP_O, *open complex*; (Abb. 4b, rechts) und die Transkription mit dem Ablösen von PspF beginnt (Sharma *et al.*, 2014). Diese Aktivierung der Transkription durch PspF wird durch Bindung von PspA an die AAA+-Domäne von PspF inhibiert (Elderkin *et al.*, 2002). Für den inhibitorischen Komplex (PspA·F-Komplex) wurde über Gelfiltrationsstudien ((Joly *et al.*, 2009) und Fluoreszenzanalysen (s.o.; Lenn *et al.*, 2011) ein 6:6-Verhältnis (PspA:PspF) bestimmt, in dem PspA als hexamerer Oligomer vorliegt. Die Inhibition der *psp*-Induktion geschieht nicht durch sterische Behinderung, da auf Basis von *In-vitro*-Gelshift-Experimenten mit PspA, PspF und σ^{54} gezeigt werden konnte, dass PspF gleichzeitig mit PspA, der DNA und σ^{54} interagieren kann, und dass PspA ebenfalls in der Lage ist, an einen PspF· σ^{54} -Komplex zu binden, in dem PspF zuvor mittels ADP-AlF_x im Übergangszustand der ATP-Hydrolyse fixiert wurde (Joly *et al.*, 2009). PspA inhibiert aber die ATPase-Aktivität von PspF durch Bindung und verhindert somit die RP_O-Bildung der σ^{54} -RNAP (Elderkin *et al.*, 2002). In Fragmentationsstudien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die für die PspF-Inhibition benötigten Determinanten auf PspA im Fragment PspA₁₋₁₈₆ liegen (Elderkin *et al.*, 2002). Auf der Oberfläche von PspF konnten W56 (Elderkin *et al.*, 2005) sowie benachbarte Aminosäuren (der W56-Loop; Zhang *et al.*, 2013) als möglicher PspA-bindender Bereich identifiziert werden, da PspF^{W56A} und PspA keinen stabilen Komplex in Gelfiltrationen bilden konnten.

Neuere Studien zu PspA versuchen seine Membraninteraktion sowie seine Interaktion mit PspF näher zu beleuchten, so wurde von Jovanovic *et al.* (2014) die Existenz zweier amphipatischer Helices im N-terminalen Bereich von PspA postuliert, die für die sequenzielle Membraninteraktion und Bindung des hydrophoben W56-Loops auf PspF verantwortlich sein sollen. Die Struktur von PspA konnte bisher nicht

geklärt werden, sodass für die Erklärung der PspA–PspF–Interaktion Strukturvorhersagen herangezogen werden, die jedoch aufgrund des Fehlens vergleichbarer Strukturen nur von sehr geringer Aussagekraft sind (Zhang *et al.*, 2013). Somit sind die strukturellen Determinanten für die PspA–PspF–Interaktion auf Seiten von PspA bisher nicht identifiziert worden, sodass keine strukturelle Vorstellung und kein mechanistisches Modell der PspA–PspF–Interaktion sowie der Regulation der PspF–abhängigen Transkriptionsaktivierung existiert.

1.6 Zielsetzung

Da die exakte Funktion des *psp*–Systems, wie oben dargestellt, weitgehend unbekannt ist, und die Bearbeitung dieser Fragestellung durch die widersprüchlichen und erratischen Phänotypen der Induktion des Systems erschwert werden, lag das vornehmliche Ziel dieser Arbeit in der Identifikation der Strukturelemente von PspA, möglicher Domänen und ihrer Funktionen. Hier stand, nachdem erste Untersuchungen zur Selbst–Oligomerisierung in Fortführung der in Osadnik (2009) entwickelten Ansätze nicht erfolgreich waren, insbesondere die Interaktion von PspA mit PspF im Vordergrund, da diese die einzige Interaktion innerhalb des Psp–Proteine darstellt, deren physiologischer Zweck, die Regulation des *psp*–Systems, bisher mit großer Sicherheit identifiziert werden konnte. Hier sollten auf Basis einer genauen Identifizierung der PspF–bindenden Domäne Interaktionsdeterminanten auf PspA identifiziert, und ihre Auswirkung auf die PspA–PspF–Interaktion untersucht werden. Um den komplexen Beziehungen der Psp–Komponenten untereinander (wie z.B. den Feedback–Loops) Rechnung zu tragen, wurden mehrere experimentelle Ansätze *in vivo*, *in vitro* und *in silico* verfolgt, um eine möglichst viel-dimensionale Beschreibung dieser Interaktion und ihrer Konsequenzen für die *psp*–Regulation im PspA·F–Komplex zu erhalten. Nachdem mit PspA_{1–144} im Rahmen dieser Arbeit die PspF–Bindedomäne von PspA identifiziert werden konnte, wurde die mögliche Oligomerisierung von PspA durch den Rest des Proteins grundlegend untersucht, da auch die Oligomerisierung eine zentrale Eigenschaft von PspA darstellt. Das PspA–Homolog YjfJ, welches neben dem bekannten PspA

1 Einleitung

ebenfalls in *E. coli* existiert, wurde auf Ähnlichkeit zu PspA hin untersucht, da dieses System bisher völlig uncharakterisiert ist. Im Zuge dieser Experimente konnte die hohe Ähnlichkeit von YjfJ und PspA deutlich gemacht werden. Die erhaltenen Ergebnisse führten zu einem neuen Verständnis des *psp*-Systems und der *psp*-Regulation, welches Impulse für eine Reinterpretation des *psp*-Systems lieferte.

2 Material und Methoden

Alle verwendeten Labormaterialien und Medien wurden bei für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Substanzen (Antibiotika etc.) wurden sterilfiltriert (Spritzenfilter, Rotilabo, Carl Roth, Karlsruhe) und Medien erst nach Abkühlung zugegeben. In allen Versuchen wurde bi–destilliertes Wasser verwendet. Alle Anzuchten erfolgten, so nicht anders angegeben, bei 37 °C in LB–Medium (1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt), schüttelnd in Kolben (~180 U/min) bzw. in geregelten 10-l–Fermentern (New Brunswick, Enfield, CT). Zum Herstellen fester Medien wurden 1,5 % (w/v) Bactoagar vor dem Autoklavieren zugegeben. Antibiotika (Ampicillin, 100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$; Kanamycin, 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$; Chloramphenicol, 25 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$; jeweils Endkonzentration) wurden je nach Bedarf verwendet.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Sämme sind in Tabelle 1 aufgeführt. Für alle Messungen der Aktivität des *pspA*–Promotors wurde der Stamm *E. coli* MC3 (Bergler *et al.*, 1994) verwendet, in dessen λ –*attachement site* eine *pspA*–*lacZ*–Fusion integriert ist. Arabinose–resistente Klone dieses Stammes wurden mittels wiederholtem Ausstrich auf 1 % (w/v) Arabinose enthaltenden LB–Agaroseplatten selektiert. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Versuche wurden mit diesem Klon durchgeführt, um artifizielle Phänotypen durch schwankende Arabinose–Level in den Zellen zu vermeiden (Lindenstrauss *et al.*, 2010). Δ *psp*–Reporterstämme auf Basis dieses Klons wurden durch P1–Phagentransduktion nach Thomason *et al.* (2007) aus *E. coli* MC3 und den *E. coli* BW25113–*psp*–Deletionsstämmen der *Keio Collection* (Baba *et al.*, 2006) hergestellt, und die erfolgreiche Transduktion mittels geeigneter Primer der umliegenden *psp*–Gene überprüft. Für Transformationen

wurden CaCl_2 -kompetente Zellen der Stämme nach Sambrook und Russell (2001) hergestellt bzw. eine Fast-Transformation nach Chung *et al.* (1989) durchgeführt.

2.1.2 Plasmide und Klonierungen

Klonierungen erfolgten wie zuvor beschrieben (Osadnik, 2009; Mehner, 2011) mit Restriktionsenzymen von New England Biolabs (Frankfurt am Main) und, je nach Erfolg dieser Protokolle, mit diversen Anpassungen. Details zu den jeweiligen Klonierungen und verwendeten Restriktionsenzymen finden sich in den folgenden Abschnitten. Alle Primer wurden von Biomers (Ulm) synthetisiert, Plasmidreinigungen erfolgten mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit 1 (peqlab, Erlangen). Reinigungen von PCR-Produkten bzw. restringierten DNA-Fragmenten erfolgten mittels NucleoSpin Extract Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben. Alle konstruierten Plasmide wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft (Seqlab-Microsynth, Göttingen).

Plasmide

In dieser Arbeit wurden die unten aufgeführten Plasmide als Ausgangspunkt für Klonierungen verwendet (Tab. 2). Für eine bessere Kompatibilität der Vektoren untereinander (insbesondere ihrer Restriktionsschnittstellen) wurden der pBW-Vektor sowie der pUL-Vektor über Primerüberhänge eines amplifizierten *pspF* modifiziert (pBW_{OT2} bzw. pUL_{OT2}) sodass beide eine 3'-XhoI-Schnittstelle aufwiesen (Verdau mit NdeI-HindIII für die Erstklonierung), zur Herstellung (mit *pspA* als Insert) siehe Tabelle 8. Die für Klonierungen verwendeten Restriktionsenzyme (entsprechend als Primerüberhänge in den PCR-Produkten enthalten) sind ebenfalls angegeben.

PspA Fragmentierung und Varianten

Zur Fragmentierung von PspA wurden die entsprechenden Genbereiche mittels Kombinationen von 5'-Forward- und 3'-Reverse-Primern amplifiziert (Tab. 4 gibt die Primer an, *pspA*-NX steht dabei für die erste mit diesem Primer codierte

Tabelle 1 Stämme und ihre Charakteristika

Bezeichnung	genetische Charakteristika	Quelle/Referenz
BW25113	$\Delta araBAD567$, $lacIp-$ $4000(lacI^Q)$, $\Delta rhaBAD568$, $\Delta lacZ4787::rrnB-3$, λ^- , $rph-1$, $hsdR514$	Datsenko und Wanner, 2000
JWK1297	BW25113 $\Delta pspA::kan$	Baba <i>et al.</i> , 2006
JWK1298	BW25113 $\Delta pspB::kan$	Baba <i>et al.</i> , 2006
JWK1299	BW25113 $\Delta pspC::kan$	Baba <i>et al.</i> , 2006
JWK5716	BW25113 $\Delta pspG::kan$	Baba <i>et al.</i> , 2006
JWK1296	BW25113 $\Delta pspF::kan$	Baba <i>et al.</i> , 2006
MC4100	$araD139$, $\Delta(lac)U169$, $relA1$, $rpsL150$, thi , mot , $flB5301$, $deoC7$, $ptsF25$, $rbsR$, F^-	Casadaban, 1976
MC3	MC4100 mit integriertem $\lambda\phi AD3$, 529 bp psp -Promotor mit $lacZ$ fusioniert	Bergler <i>et al.</i> , 1994
MC3 $\Delta pspA::kan$	aus P1-Transduktion von MC3 mit JW1297	diese Arbeit
MC3 $\Delta pspB::kan$	aus P1-Transduktion von MC3 mit JW1298	diese Arbeit
MC3 $\Delta pspC::kan$	aus P1-Transduktion von MC3 mit JW1299	diese Arbeit
MC3 $\Delta pspG::kan$	aus P1-Transduktion von MC3 mit JW5716	diese Arbeit
MC3 $\Delta pspF::kan$	aus P1-Transduktion von MC3 mit JW1296	diese Arbeit
XL1-Blue	F' $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-$ $hsdSMR-mrr)173$, $endA1$, $su-$ $pE44$, $thi-1$, $recA1$, $gyrA96$, $relA1$, $lac(F^- proAB, lacI^Q,$ $Z\Delta M15 Tn5 (kan^R))$, ultra- kompetent	Stratagene (Heidelberg)

Tabelle 2 Ausgangsplasmide für Klonierungen

Bezeichnung	Charakteristika	Restriktion	Quelle/Referenz
pBAD22	<i>araC, araBAD</i> -Promotor, Amp ^R	NcoI XhoI	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pBW22	<i>rhaBAD</i> -Promotor, ColE1- origin, Amp ^R	NdeI BamHI	Wilms <i>et al.</i> , 2001
pBW _{OT2}	pBW22 mit 3'-XhoI- BamHI-h ₆ -BamHI-HindIII -Schnittstelle	NdeI XhoI	diese Arbeit
pUL-Ptat	pCHAPS-Derivat mit pSC101- origin, Cam ^R	NdeI HindIII	Mehner, 2011
pUL _{OT2}	pUL-Ptat mit 3'-XhoI-HindIII -Schnittstelle	NdeI XhoI	diese Arbeit

Aminosäure (5'-Forward), *pspA*-CX für die letzte (3'-Reverse); Cstop bezieht sich auf Primer die für ein Stop-Codon codieren, wodurch *tag*-freie Fragmente auf ihre regulativen Eigenschaften hin untersucht werden konnten). Die Restriktion erfolgte mit NcoI und XhoI (Zielvektor pBAD22), die erhaltenen Plasmide inklusive der Primerkombinationen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Für die Herstellung des C-terminalen PspA-Fragmentes mit GW-Linker (Tryptophan-markiert für besser UV-Detektion) wurde, wie angegeben, der pBW_{OT2} verwendet.

Zur Einführung von Einzelaminosäureaustauschen in PspA wurden zwei Methoden verwendet. Ein Großteil der Austausche wurde mittels *mismatches* in komplementären Primern eingeführt. Hierbei wurde nach dem Standard-Quikchange-Protokoll (Agilent, Santa Clara, CA) verfahren und die PCR-Strategie je nach Erfolg des Standard-Verfahrens modifiziert. Die finalen für die Versuche verwendeten Plasmide sind in Tabelle 5 aufgeführt. In einem zweiten Ansatz wurde mittels *silent mutagenesis* eine BspHI-Schnittstelle in das für L31 codierende Codon eingebracht. Hierzu wurden zwei Fragmente von *pspA* hergestellt (5'-bis BspHI, BspHI bis 3') und in einer anschließenden Doppelligation (pBAD22 mit NcoI/XhoI geschnitten, 5'-Fragment mit NcoI/BspHI, 3'-Fragment mit BspHI/XhoI) das neue Plasmid hergestellt (Tab. 6). Weitere Austausche erfolgten dann durch in 5' bzw. 3' von der BspHI-Schnittstelle ausgehenden Primern, wobei mit dem respektiven

pspA-Primer (*pspA*-N1 bzw. *pspA*-C222) eine PCR durchgeführt und mittels NcoI/BspHI-Verdau bzw. BspHI/XhoI-Verdau kloniert wurde.

Klonierung von *pspF*, und Genen des *yjf*-Systems

Zur Klonierung von *pspF* wurde das pBW_{OT2}-Plasmid verwendet, welches zuvor durch ein NdeI-PstI-verdautes PCR-Produkt (*pspA* mit 3'-XhoI-BamHI-h₆-BamHI-PstI-Überhang) aus pBW22 hergestellt wurde. Mittels BamHI-Verdau kann in diesem Plasmid in einem Schritt der Histidin-*tag* entfernt werden. Die weiteren Klonierungen erfolgten analog zu *pspA*, die W56A-Variante von PspF wurde ebenfalls über Quikchange hergestellt, und Fragmentierungen (für das verkürzte PspF₁₋₂₆₅) des WT-PspF bzw. seiner W56A-Variante durchgeführt. Primer und finale Plasmide finden sich in Tabelle 7. Die Klonierung von *yjfJ*, sowie das Einbringen von Einzelaustauschen erfolgte analog zu *pspA*. Zur Klonierung von *yjfI* und *yjfJ* wurde wie mit *pspF* verfahren. Primer und finale Plasmide finden sich hierzu in Tabelle 8.

Tabelle 3 Primer für Fragmentierungen von PspA

Primer	Sequenz (5' → 3')
pspA-N1	ATATACCCATGGGTATTTTTTCTCGCTTTGC
pspA-N5	TATATCCATGGGTTCTCGCTTTGCCGACATC
pspA-N8	TATATCCATGGGTGCCGACATCGTGAATG
pspA-N12	TATATCCATGGGTAATGCCAACATCAACGCTC
pspA-N17	TATATCCATGGGTGCTCTGTTAGAGAAAGCGG
pspA-N21	TATATCCATGGGTAAAGCGGAAGATCCACAGAAAC
pspA-N26	TATATCCATGGGTCAGAAACTGGTTCGTCTGATG
pspA-N146	ATATACCCATGGGTCAGGCGGCAAACCTCGTC
pspA-N160	ATATACCCATGGGTAAACTGGATGAAGCAATGG
pspA-C25	ATATACTCGAGCAGTGTATCTTCCATCTCCTG
pspA-C40	ATATACTCGAGCTGCCATTCAACCTCACG
pspA-C71	ATATACTCGAGTGCCAGATCCTCTCTCTC
pspA-C116	ATATACTCGAGCGTATCGTCCACCAG
pspA-C121	ATATACTCGAGGGCCTCTTTCTTTCATGCGTGC
pspA-C124	ATATACTCGAGGGCCTCGCCAATCTCTTTCTTC
pspA-C128	ATATACTCGAGTTTGTCTTCCAGCTCGC
pspA-C131	ATATACTCGAGTTCGCTCAATTTGTTTTCCAG
pspA-C135	ATATACTCGAGGCGAGCGCGT
pspA-C144	ATATACTCGAGCTGATGACGTAACATCAATGC
pspA-C160	ATATACTCGAGTTTGCCACTGTCCAG
pspA-C168	ATATACTCGAGGAAACGAGCCATTGCTTCATC
pspA-C175	ATATACTCGAGAATACGACGTTTCGAAAGATTCGAAAC
pspA-C187	ATATACTCGAGGAAGCTGTGGCTTTCTGC
pspA-C196	ATATACTCGAGATCGTCCAGCGATTTTTGTTTACC
pspA-C222	ATATACTCGAGTTGATTGTCTTGCTTCATTTTGGCTTTTA
pspA-C116stop	ATATACTCGAGTCACGTATCGTCCACCAG
pspA-C121stop	ATATACTCGAGGGCTCACTCTTTCTTTCATGCGTGC
pspA-C124stop	ATATACTCGAGGGCTCACTCGCCAATCTCTTTCTTC
pspA-C128stop	ATATACTCGAGTCATTTGTTTTCCAGCTCGC
pspA-C131stop	ATATACTCGAGTCATTCGCTCAATTTGTTTTCCAG
pspA-C135stop	ATATACTCGAGTCAGCGAGCGCGTGTT
pspA-C144stop	ATATACTCGAGTCACTGATGACGTAACATCAATGC
pspA-C-GW	ATATACTCGAGCCAGCCTTGATTGTCTTGCTTCATTTTGG→ →CTTTTAATTG

Bei überlangen Primern wurde ein Zeilenumbruch (→) eingefügt

Tabelle 4 Plasmide für Fragmentstudien mit PspA

Plasmid	<i>pspA-X-F</i>	<i>pspA-X-R</i>
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₂₅ - <i>h</i> ₆	N1	C25
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₄₀ - <i>h</i> ₆	N1	C40
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₇₁ - <i>h</i> ₆	N1	C71
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₈₅ - <i>h</i> ₆	N1	C85
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₁₆ - <i>h</i> ₆	N1	C116
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₂₁ - <i>h</i> ₆	N1	C121
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₂₄ - <i>h</i> ₆	N1	C124
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₂₈ - <i>h</i> ₆	N1	C128
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₃₁ - <i>h</i> ₆	N1	C131
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₃₅ - <i>h</i> ₆	N1	C135
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>h</i> ₆	N1	C144
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₆₀ - <i>h</i> ₆	N1	C160
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₆₈ - <i>h</i> ₆	N1	C168
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₇₅ - <i>h</i> ₆	N1	C175
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₈₇ - <i>h</i> ₆	N1	C187
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₉₅ - <i>h</i> ₆	N1	C195
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₂₂ - <i>h</i> ₆	N1	C122
pBAD- <i>pspA</i> ₅₋₁₄₄ - <i>h</i> ₆	N5	C144
pBAD- <i>pspA</i> ₈₋₁₄₄ - <i>h</i> ₆	N8	C144
pBAD- <i>pspA</i> ₁₂₋₁₄₄ - <i>h</i> ₆	N12	C144
pBAD- <i>pspA</i> ₁₇₋₁₄₄ - <i>h</i> ₆	N17	C144
pBAD- <i>pspA</i> ₂₁₋₁₄₄ - <i>h</i> ₆	N21	C144
pBAD- <i>pspA</i> ₂₆₋₁₄₄ - <i>h</i> ₆	N26	C144
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₁₆ - <i>stop</i>	N1	C116stop
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₂₁ - <i>stop</i>	N1	C121stop
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₂₄ - <i>stop</i>	N1	C124stop
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₂₈ - <i>stop</i>	N1	C128stop
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₃₁ - <i>stop</i>	N1	C131stop
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₃₅ - <i>stop</i>	N1	C135stop
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>stop</i>	N1	C144stop
pBAD- <i>pspA</i> ₁₄₆₋₁₈₇ - <i>h</i> ₆	N146	C187
pBAD- <i>pspA</i> ₁₄₆₋₁₉₆ - <i>h</i> ₆	N146	C196
pBAD- <i>pspA</i> ₁₄₆₋₂₂₂ - <i>h</i> ₆	N146	C222
pBAD- <i>pspA</i> ₁₆₀₋₁₉₆ - <i>h</i> ₆	N160	C196
pBAD- <i>pspA</i> ₁₆₀₋₂₂₂ - <i>h</i> ₆	N160	C222
pBW _{OT2} ^W - <i>pspA</i> ₁₆₀₋₂₂₂ - <i>h</i> ₆	N1(Nde)	C-GW

Tabelle 5 Quikchange-Primerpaare für Einzelaustausche in PspA

Plasmid	Primerpaar der Einzelaustausche (5' → 3')
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>E23A-h6</i>	CTGTTAGAGAAAAGCGGCTGATCCACAGAAACTGG CCAGTTTCTGTGGATCAGCCGCTTTCTCTAACAG
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>D24A-h6</i>	GAGAAAAGCGGAAGCTCCACAGAAACTGG CCAGTTTCTGTGGAGCTTCCGGCTTTCTC
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>L28A-h6</i>	GGAAGATCCACAGAAAAGCGGTTGCTGTGATGATC GATCATCAGACGAAACCGCTTTCTGTGGATCTCC
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>L31A-h6</i>	CAGAAACTGGTTCTGTCGGATGATCCAGGAGATG CATCTCCTGGATCATCGCACGAACCACTTTCTG
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>Q34A-h6</i>	CTGGTTCGTCTGATGATCGCAGAGATGGAAAGATACACTG CAGTGTATCTTCCATCTCTGCGATCATCAGACGAACCCAG
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₂₂₂ - <i>Q34A-h6</i>	wie pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>Q34A-h6</i>
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>E37A-h6</i>	GATGATCCAGGAGATGGCAGATACACTGGTTGAAG CTTCAACCAGTGTATCTGCCATCTCCTGGATCATC
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₂₂₂ - <i>E37A-h6</i>	wie pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>E37A-h6</i>
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>K55A-h6</i>	CGTTGGCAGAAAAGGCACAGCTGACTCGC GCGAGTCAGCTGTGCCCTTTCTGCCAACG
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>K55E-h6</i>	CGTTGGCAGAAAAGGAACAGCTGACTCG CGAGTCAGCTGTCCCTTTTCTGCCAACG
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>R59A-h6</i>	GAAAAGAAAACAGCTGACTGCCCGTATTGAACAAGCGTC GACGCTTGTCAATACGGGCAGTCAGCTGTTTCTTTTC
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>R59E-h6</i>	GAAAAGAAAACAGCTGACTGAACGTATTGAACAAGCGTCGG CCGACGCTTGTTCATAATACGTTTCAGTCAGCTGTTTCTTTTC
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>ED84/QN-h6</i>	CGCTGCTGAAAAGAGAGACAGAATCTGGCACGTCGACG GCTGCAAGTCGCCAGATTCTGTCTCTCTTTTCAGCAGCG
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>D85N-h6</i>	CTGAAAAGAGAGAGAGAATCTGGCACGTCGACG

Tabelle 5 — Fortsetzung

pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>Q136A</i> - <i>h</i> ₆	CTGCACGTGCCAGATTCTCTCTCTCTTCAG CACGGCTCGCGCCAGGCATTGATGTTACGTCATCAGTGACTCGAGATATA TATATCTCGAGTCACTGATGACGTAACATCAATGCCCTGGCGGAGCGCGTG CACGGCTCGCAACAGGCATTGATGTTACGTCATCAGTGACTCGAGATATA TATATCTCGAGTCACTGATGACGTAACATCAATGCCCTGTTTGGCGAGCGCGTG
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>Q136K</i> - <i>h</i> ₆	pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>Q34A</i> - <i>h</i> ₆ mit Primern für ED84QN
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>Q34A</i> - <i>ED84QN</i> - <i>h</i> ₆	pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>E37A</i> - <i>h</i> ₆ mit Primern für ED84QN
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>E37A</i> - <i>ED84QN</i> - <i>h</i> ₆	pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>Q34A</i> - <i>h</i> ₆ mit Primern für D85N
pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>E37A</i> - <i>D85N</i> - <i>h</i> ₆	pBAD- <i>pspA</i> ₁₋₁₄₄ - <i>E37A</i> - <i>h</i> ₆ mit Primern für D85N

Tabelle 6 *Silent mutagenesis* (BspHI-Schnittstelle) für Einzelaustausche in FBRI

Plasmidname	Primersequenz (5' → 3')
pBAD- <i>pspA</i> _{BspHI-L31-h6}	
Fragment 1-31	GTTGATTGCTTGGCTTCATTTGGCTTTA CACAGAAACTGGTTCGTCTCATGATATATATATATCATGA → →GACGAACCAGTTTCTGTG
Fragment 31-222	TATATTTCATGATTCAGGAGATGGAAGATACAC ATATACCCATGGGTATTTTTTCTCGCTTTGC
Weitere Austausche	ATATATCATGATTCAGGCAATGGAAGATACACTGGTTGAAG ATATATCATGATTCAGGAGGCAGAAAGATACACTGGTTGAAGTACG GAAAGCGGAAGATCCACAGGCACCTGGTTCGTCTCATGAATATATAT → →ATTTCATGAGACGAAACCAGTGCCTGTGGATCTTCCGCTTTC GAAAGATCCACAGAAACTGGTTGCACATCATGAATATATATATTCATGA → →GTGCAACCAGTTTCTGTGGATCTTTC
pBAD- <i>pspA</i> _{BspHI-1-144-E35A-h6}	
pBAD- <i>pspA</i> _{BspHI-1-144-M36A-h6}	
pBAD- <i>pspA</i> _{BspHI-1-144-K27A-h6}	
pBAD- <i>pspA</i> _{BspHI-1-144-R30A-h6}	
pBAD- <i>pspA</i> _{BspHI-1-144-D38A-h6}	
pBAD- <i>pspA</i> _{BspHI-1-144-D38A-h6}	

Bei überlangen Primern wurde ein Zeilenbruch (→) eingefügt

Tabelle 7 Klonierung von *pspF*

Plasmid	Primernamen	Sequenz (5' → 3')
pBW _{OT2} -Ausgangsplasmid		
pBW _{OT2} - <i>pspA</i> - <i>h6</i>	pspA-N-Nde pspA-XhoI-BamHI- <i>h6</i> - BamHI-PstI-R	ACAACCATATGGGTATTTTTTCTCGCTTTGC ATATACTGCAGTCAGGATCCTCAATGA → →TGATGATGATGATGGGATCCCCTCGAGTTG → →ATTGTCTTGGCTTCAATTTTG
<i>pspF</i> -Klonierung in pBW _{OT2}		
pBW _{OT2} - <i>pspF</i> - <i>h6</i>	pspF-F pspF-Xho-Hind-R	TATATCATATGGCAGAATAACAAAGATAATTTACTTTGGT TATATAAGCTTACTCGAGAATCTGGTGCTTTTCAACAACCG
W56A-Austauschprimer		
pBW _{OT2} - <i>pspF</i> ^{W56A} - <i>h6</i>		CATTATCTCTCCTCCCGTGGCAAGGGCCGTTTATTTT GAAATAAACGGCCCTTGGGCACGGGAGAGAGATAAATG
Gen für verkürzte Fragmente mit/ohne W56A in pBW		
pBW _{OT2} - <i>pspF</i> ^(W56A) ₁₋₂₆₅ - <i>h6</i>	pspF-F pspF ₂₆₅ -R	TATATCATATGGCAGAATAACAAAGATAATTTACTTTGGT ATATACTCGAGGGCGATAGCGTCTTCAG
Gen für verkürzte Fragmente mit/ohne W56A in pUL		
pUL _{OT2} - <i>pspF</i> ^(W56A)	pspF-F pspF-Xho-Hind-R	TATATCATATGGCAGAATAACAAAGATAATTTACTTTGGT TATATAAGCTTACTCGAGAATCTGGTGCTTTTCAACAACCG

Bei überlangen Primern wurde ein Zeilenumbruch (→) eingefügt

Tabelle 8 Klonierung und Einzelaustausche von *yjfJ*

Plasmid	Primersequenz (5' → 3')
Grundvektoren	
pBAD- <i>yjfJ</i> - <i>h</i> ₆	TATATCCATGGGTGGAATTTTAAAAAGTTTATTTACGCTGGG ATATACTCGAGCTCGCCCTGTTGGC
pUL _{OT2} - <i>yjfJ</i> - <i>strep</i>	TATATCATATGGGAATTTTAAAAAGTTTATTTACGCTGGG ATATACTCGAGCTCGCCCTGTTGGC
Einzelaustausche	
pBAD- <i>yjfJ</i> - <i>Q33A</i> - <i>h</i> ₆	GCGCATGCTGGAAGCGCATATTCGTGACG CGTCACGAATATGCGCTTCCAGCATGCGC
pBAD- <i>yjfJ</i> - <i>I35A</i> - <i>h</i> ₆	GCATGCTGGAACAGCATGCGCGTGACGCTAAAGCTG CAGCTTTAGCGTCACGCGCATGCTGTTCCAGCATGC
pBAD- <i>yjfJ</i> - <i>R36A</i> - <i>h</i> ₆	CATGCTGGAACAGCATATTTGCGGACGCTAAAGCTGAACTCG CGAGTTCAGCTTTAGCGTCCGCAATATGCTGTTCCAGCATG
pBAD- <i>yjfJ</i> - <i>D37A</i> - <i>h</i> ₆	GGAACAGCATATTCGTGCGGCTAAAGCTGAACTCG CGAGTTCAGCTTTAGCCGCACGAATATGCTGTTCC
pBAD- <i>yjfJ</i> - <i>V142A</i> - <i>h</i> ₆	CAGCAAATGGAAGTCGCGAAAGCCACTGAAGCC GGCTTCAGTGGCTTTCGCGACTTCCATTTGCTG
pBAD- <i>yjfJ</i> - <i>K143A</i> - <i>h</i> ₆	GCAAATGGAAGTCGTTGCGGCCACTGAAGCCATGC GCATGGCTTCAGTGGCCGCAACGACTTCCATTTGC
pBAD- <i>yjfJ</i> - <i>E146A</i> - <i>h</i> ₆	GAAGTCGTTAAAGCCACTGCGGCCATGCAGCGTGCACAAC GTTGTGCACGCTGCATGGCCGAGTGGCTTTAACGACTTC
Klonierung von <i>yjfJ</i> und <i>yjfK</i>	
pBW _{OT2} - <i>yjfI</i> - <i>h</i> ₆	TATATCATATGACATGGAATCCGTTGGC ATATACTCGAGGTGTGAATATTCTTCTGTAATTTTCAGCC
pBW _{OT2} - <i>yjfK</i> - <i>h</i> ₆	TATATCATATGTCTGGTTTTTTCCAGCGTC ATATAGAGCTCACCAATAATATGAAGTGATGTCAGCG

2.2 Zellanzucht und Proteinreinigungen für *In-vitro*-Studien

Zellanzucht

Für Standard-Proteinreinigungen wurde Medium mit einer Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft. In der exponentiellen Wachstumsphase ($\sim OD_{600}$ 0,8) wurde die Proteinproduktion mit 0,1 % (w/v) Arabinose (pBAD) bzw. Rhamnose (pBW) induziert. Nach 4 h erfolgte die Zellernte bei 6.000 g (Sorvall RC-5C PLUS, Waltham, MA). Die Zellpellets wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Proteinreinigung mittels Ni-IMAC und Ionentauscher

Der Zellaufschluss erfolgte nach Lösen der Zellen in 3 bis 5-fachem Volumen Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol) mittels French Press (2 Durchgänge, 138 MPa). Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C . Nach der Zelltrümmerabtrennung (20 min, 5.000 g, Eppendorf 5804 R) wurde Membranen und weitere unlösliche Bestandteile mittels Ultrazentrifugation (140.000 g, 1 h, Beckman Optima L-80 XP, SW32Ti-Rotor) abgetrennt. Der Überstand wurde für die Ni-IMAC-Reinigung weiterverwendet. Für Lokalisationsstudien wurde das Pellet der Ultrazentrifugation im gleichen Puffervolumen wieder aufgenommen, und Proben des Überstandes und des resuspendierten Pellets mittels Schägger-PAGE und Wester-Blot verglichen. Mittels Ni-IMAC (*Nickel-immobilized metal affinity chromatography*) wurden die His-tag-fusionierten, rekombinant produzierten Proteine für die weitere Reinigung angereichert. Dazu wurde eine äquilibrierte Ni-NTA-Säulenmatrix (Quiagen; 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol) mit der lösliche Fraktion der Ultrazentrifugation beschickt. Das Säulenvolumen richtete sich nach der erwarteten Proteinausbeute der Zellanzuchten und betrug im Regelfall zwischen 4 ml (PspF aus ~ 60 g Zellen aus einer Fermenteranzucht) und 0,7 ml (~ 15 g Zellen aus 3×1 -l-Kolbenanzuchten). Nach dem Durchlauf wurde die Säule mit 5 Volumen Puffer gewaschen, und daraufhin das

2 Material und Methoden

Protein eluiert ($4 \times 0,5$ und 3×1 Säulenvolumen; 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol). Wenn auf die Ni-IMAC direkt der Ionentauscher folgte, und das Protein bereits mehrfach erfolgreich gereinigt werden konnte, wurde auf eine fraktionierte Elution verzichtet, und das Protein in einem einzigen Schritt ($5 \times$ Säulenvolumen) eluiert. Die durch Ni-IMAC angereicherten Proteine wurden zur vollständigen Abtrennung von Kontaminanten über einen Ionentauscher gereinigt (Resource Q1 bzw. Q6 an einem ÄKTA Purifier, alle GE Healthcare, Chalfont St. Giles). Um eine Bindung des sich im Elutionspuffer der Ni-IMAC gelösten Proteins an die Matrix zu ermöglichen, wurde die Ni-IMAC-Elutionsfraktion 1:5 (PspF) bis 1:10 (PspA, Yjfl) in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 verdünnt. Nach Beladen der mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0 äquilibrierten Säule und Waschen mit zwei Säulenvolumen dieses Puffers wurde die Salzkonzentration im Puffer über ein Volumen von 20 bis 40 Säulenvolumen sukzessive bis 500 mM NaCl erhöht, und dann über einen Sprung auf 1 M NaCl restliche Kontaminanten von der Säule entfernt. Während des Gradienten wurde die Absorption des eluierenden Puffers bei 230 nm verfolgt, und Elutionsfraktionen (je 0,5-1 Säulenvolumen) gesammelt. Die Überprüfung des Reinigungserfolges erfolgte mittels Schägger-PAGE von Proben der Elutionsfraktionen.

Konzentrationsbestimmung und Pufferwechsel

Sowohl PspF₁₋₂₆₅ als auch PspA₁₋₁₄₄ und ihre Varianten konnten in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl bei -80 °C langfristig gelagert werden. Sie zeigten keinen meßbaren Aktivitätsverlust in ATPase-Assays bzw. Aggregation in der AUC oder SEC. Sie wurden entweder per ÄKTA Purifier und HiTrap-Säulen (GE Healthcare Life Sciences) aus dem Ionentauscher-Puffer in den Lagerpuffer überführt, oder per Ultrafiltration (Vivaspin, 10.000 MWCO, Sartorius Stedim, Göttingen) in der Tischzentrifuge (4.000 g; Eppendorf 5804 R), wo kein Verlust der Proteine in den filtrierten Puffer bzw. durch Interaktion mit dem Filtermaterial beobachtet werden konnte. Proteinkonzentrationen wurden standardmäßig mittels NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts) über den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm bestimmt. Für ATPase-Assays, bei denen die eingesetzten Konzentra-

tionen sehr genau bestimmt werden mussten und gleichzeitig sehr gering waren, wurde die Konzentration mittels UV/Vis-Spektrophotometers in vier gemittelten Durchgängen bestimmt (Jasco V-650 Gross-Umstadt).

Reinigung von SeMet-PspA₁₋₁₄₄

Zur Lösung des Phasenproblems wurde Seleno-Methionin-markiertes PspA₁₋₁₄₄ (SeMet-PspA₁₋₁₄₄) verwendet. Die Anzucht der Zellen und die Reinigung von SeMet-PspA₁₋₁₄₄ geschah gemäß der Standardprozedur, mit einigen Anpassungen: Die Zellanzucht erfolgte in M9-Medium (Sambrook und Russell, 2001) mit 0,1 % (w/v) Glucose als C-Quelle und 0,1 % (v/v) SL12 Spurenelementlösung (Overmann *et al.*, 1992). Seleno-Methionin (ACROS organics/Fisher Scientific, Schwerte) wurde 15 Minuten vor Induktion der rekombinanten Genexpression bei gleichzeitiger Unterdrückung der Methionin-Biosynthese hinzugegeben (Van Duyne *et al.*, 1993). Weiterhin wurde den Puffern in allen Reinigungsschritten 5 mM 2-Mercaptoethanol zugesetzt, um eine Oxidation des Selens zu verhindern.

Kristallisation und Strukturaufklärung

Gereinigtes PspA₁₋₁₄₄ wurde mittels *Hanging-drop*-Methode² in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 und 50 mM NaCl bei bis zu 9 $\frac{mg}{ml}$ kristallisiert. Dazu wurden 1 μ M PspA₁₋₁₄₄ mit 1 μ M HEPES/NaOH pH 7,5, 10 % (w/v) Polyethylenglycol 6.000 und 5 % (v/v) 2-Methyl-2,4-Pentandiol gemischt und bei 15 °C inkubiert. Über *seeding* der Kristalle in 2 $\frac{mg}{ml}$ Protein in einer modifizierten Kristallisationspuffer (HEPES/NaOH pH 7,2, 10 % (w/v) Polyethylenglycol 6.000 und 5 % (v/v) 2-Methyl-2,4-Pentandiol) wurden schlussendlich hoch streuende Kristalle gewonnen. SeMet-PspA₁₋₁₄₄ wurde in ähnlicher Weise in 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl und 5 mM 2-Mercaptoethanol kristallisiert, aber mit *cross-seeding* durch native PspA₁₋₁₄₄-Kristalle. Die Kristalle erschienen innerhalb von 3 Tagen und erreichten ihre finale Größe in einer Woche. Nach der Zugabe von 15 % (v/v) (R.R)-(-)-2,3-Butandiol (Merck Milipore) als Cryoprotektans wurden die Kristalle schockgefrostet. Native und drei MAD-Datensätze wurden bei 100 K in der

²Methode und Datensätze bereitgestellt von C. Parthier, Strukturaufklärung durch Dr. Michael Schöpfel, Dr. Christoph Parthier und Prof. Milton Stubbs

BESSY Synchroton-*beamline* 14.1 (Helmholtz Zentrum, Berlin) gesammelt und mittels XDS (Kabsch, 2010) verarbeitet (Tab. 9]. Die Phasebestimmung erfolgte mittels SHELX (Sheldrick, 2010) und SHARP, gefolgt von SOLOMON innerhalb der autoSHARP *pipeline* (Vonnrhein *et al.*, 2007). Die Struktur konnte aufgrund ausreichend genauer Elektronendichte mit ARP/wARP (Langer *et al.*, 2008) und BUCCANEER aus der CCP4-Suite (Winn *et al.*, 2011) größtenteils automatisch eingepasst werden, weitere manuelle *Refinement*-Schritte erfolgten mittels COOT (Emsley *et al.*, 2010) und Refmac5 (Murshudov *et al.*, 1997) unter Verwendung des höchst aufgelösten nativen Datensatzes (1,8 Å). Damit konnte die Struktur für die Reste 3–20 und 24–142 gelöst werden. Die Reste 12 bis 31 zeigen signifikant höhere konformelle Diversität als der Rest der Struktur, zu sehen an den höheren B-Faktoren und der schlecht aufgelösten Elektronendichte in dieser Region. Die Struktur wurde mittels Molprobit (Chen *et al.*, 2010) validiert.

2.2.1 Biochemische Analysen und Assays

PAGE und Western-Blot

Zur Analyse der Proteinreinigungen, sowie für Co-Elutionsexperimente wurden Polyacrylamidgelelektrophoresen (Mini-Protean-Tetra-Kammern, Bio-Rad und Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen) nach Laemmli (1970) sowie insbesondere zur Auftrennung kleinerer Proteine und Fragmente (<20 kDa) nach Schagger (2006) durchgeführt. Als Marker wurde die PageRuler Prestained Plus Protein Ladder (Fermentas, Schwerte) verwendet. Zur Analyse wurden die Gele nach der Elektrophorese mit Coomassie-Färbelösung gefärbt (0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 20% Ethanol, 10% Acetat). Für Lokalisations- und Co-Elutionsstudien sowie als Kontrolle des Reinigungserfolges während der Erarbeitung von Reinigungsstrategien wurden Proteine nach der Schagger-PAGE mittels Western-Blot und Immundetektion nachgewiesen. Nach dem Western-Blot mittels Semi-Dry-Verfahren (Biometra Fastblot-Kammer B 43, Biometra, Göttingen) in Towbin-Puffer wurde die Membran (Nitrocellulose, parablott NCP, Macherey-Nagel, Düren) mit 5 %

Tabelle 9 Datensätze und *refinement* der PspA₁₋₁₄₄-Kristallisation

Datensatz	PspA ₁₋₁₄₄ nativ	SeMet-PspA ₁₋₁₄₄ MAD remote	SeMet-PspA ₁₋₁₄₄ MAD peak	SeMet-PspA ₁₋₁₄₄ MAD inflection
Radiation source	BESSY BL14,1	BESSY BL 14,1	BESSY BL 14,1	BESSY BL14,1
Wavelength (Å)	0,9184	0,9759	0,9798	0,9799
Energy (keV)	135,000	127,100	126,540	126,525
Resolution range (Å)	39,73 - 1,8	39,80 - 2,01	39,87 - 2,01	39,87 - 2,06
Highest resolution shell (Å)	1,9 - 1,8	2,13 - 2,01	2,13 - 2,01	2,18 - 2,06
Space group	C2	C2	C2	C2
Cell dimensions				
a, b, c (Å)	79,65, 30,38, 80,48	79,72, 30,39, 80,70	79,95, 30,47, 80,87	79,94, 30,43, 80,94
α, β, γ (°)	90, 115,61, 90	90, 115,27, 90	90, 115,29, 90	90, 115,28, 90
Rmerge	3,1 (39,8)	5,2 (40,9)	4,7 (42,7)	4,8 (40,4)
I / σ I	20,5 (3,5)	11,0 (2,0)	11,7 (1,9)	12,0 (2,0)
Completeness (%)	96,8 (95,6)	96,8 (94,8)	96,7 (95,1)	96,8 (95,8)
Multiplicity	3,4 (3,4)	2,2 (2,2)	2,2 (2,20)	2,2 (2,2)
Wilson B	37,2	36,8	38,7	40,0
Refinement				
No, reflections (work/test)	15170 / 798			
R _{work} / R _{free}	0,213 / 0,264			
No, atoms				
Protein	1127			
Buffer components	8			
Water	77			
B-factors (Å ²)				
Protein	54,5			
Buffer components	71,8			
Water	41,7			
R,m,s deviations				
Bond lengths (Å)	0,018			
Bond angles (°)	1,87			
Ramachandran plot (%)				
Favoured	94,9			
Allowed	2,90			
Outlier	2,20			

(w/v) Magermilchpulver in PBS geblockt, und mit Primärem und Sekundärem Antikörper inkubiert (je 1 h, dazwischen 3 Waschschrirte je 5 Minuten). Der His-*tag* der Proteine wurde mittels eines Gemisches aus Tetra- und Penta-His-Antikörper (je 1:5.000 verdünnt, Quiagen) und anschließender Inkubation mit anti-Maus-IgG-HRP-Konjugaten (1:5.000, Roth) mittels ECL-Reaktion (0,2 mM Coumarinsäure, 1,25 mM Luminol, 0,009 % H₂O₂) im ChemiBis 3.2 (Berthold, Barsinghausen) detektiert. Im Falle der Co-Elutionsstudien wurde während der Inkubation mit dem sekundären Antikörper zur His-*tag*-Detektion auch Strep-Tactin-AP-Konjugat (1:3.000, IBA, Göttingen) hinzugegeben, und ermöglichte nach der Detektion mittels ECL eine anschließende Detektion der *strep*-Fusionsproteine durch Messung der Aktivität der alkalinen Phosphatase über BCIP/NBT nach Standardprotokoll (Carl Roth, Karlsruhe). Die Detektion von PspA-Domänen erfolgte ebenfalls mit anti-PspA-Antikörpern (Standar *et al.*, 2008), 1:3.000 verdünnt, und Goat-Anti-Rabbit-IgG-HRP-Konjugat (Bio-Rad, München) und anschließender ECL-Detektion wie beschrieben.

Co-Elutionsstudien

Für die Co-Elutionsexperimente wurde *E. coli* BW25113 mit pUL-*yjfJ-strep* sowie pBW_{OT2}-*yjfI-h₆* bzw. pBW_{OT2}-*yjfK-h₆* transformiert. Hierbei erlaubte der P_{*tat*}-Promotor eine geringe, aber konstitutive Expression des *yjfJ-strep*, sodass aufgrund der geringen Proteinmenge durch Überproduktion beider Proteine induzierte Interaktionsartefakte weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Übernachtskulturen wurden auf eine OD von 0,05 verdünnt und nach 1,5 h Wachstum wurde die pBW-abhängige Yjfl/YjfK-Produktion mit 0,01 % (w/v) Rhamnose induziert. Auch hier wurde nur ein schwaches Induktionslevel gewählt, um Überproduktionsartefakte zu vermeiden. Nach weiteren 3 h Wachstum wurden die Zellen wie bereits oben zur Proteinreinigung beschrieben geerntet und bei -20 °C gelagert. Nach dem Zellaufschluss und der Zelltrümmerabtrennung wurde kein weiterer Zentrifugationsschritt mehr durchgeführt, sondern die gesamte lösliche Fraktion für die Ni-IMAC eingesetzt. Vor der Analyse über Schägger-PAGE wurden die Proteine mit Aceton gefällt (5-faches Volumen Aceton, 30 min bei -20 °C, pellettiert

und restliches Aceton abgedampft, in 1/5-Volumen SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen), und die Detektion im weiteren Verlauf wie oben beschrieben mittels ECL- und AP-Reaktionen nachgewiesen.

Gelfiltration

Gelfiltrationsanalysen wurden am ÄKTA Purifer durchgeführt. Für analytische Ansätze wurden Proteine über eine Superose-6-10/300-GL- bzw. Superdex-200-10/300-GL-Säule aufgetrennt (4 °C). Für präparative Ansätze erfolgte die Auftrennung über eine Superdex-200-16/600-HiLoad-Säule (alle GE Healthcare Life Sciences). Alle Säulen wurden mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl äquilibriert und die entsprechenden Flußraten nach Herstellervorgaben verwendet. Die Detektion erfolgte bei den jeweils angegebenen Wellenlängen. Für Untersuchungen der kleinen C-terminalen Fragmente von PspA sowie YjffI wurde eine lineare Eichkurve mittels der globulären Proteine Ovalbumin (43 kDa, Peak bei 15,51ml), Carbonic Anhydrase (29 kDa, 16,8ml) und Rnase A (13,7 kDa, 13,7 ml; alle Amersham/GE Healthcare Life Sciences) erstellt. Aufgrund des stark aberranten Laufverhaltens von PspA₁₋₁₄₄ konnte für dieses Protein sowie die Spezies in den PspA·F-Komplex-Titrations keine Größenbestimmung durchgeführt werden.

Analytische Ultrazentrifugation

Alle Messungen³ erfolgten bei 20 °C in einer Optima XL-A-Zentrifuge (Beckman, Palo Alto, CA) mit An50Ti-Rotor und Doppelsectorzellen in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, mit Ausnahme der Messungen von YjffI und ^WPspA₁₆₀₋₂₂₂, die in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei 300 mM NaCl durchgeführt wurden. Die Sedimentation von PspA₁₋₁₄₄ wurde bei 3, 10 und 30 µM und 14.000 U/min (bis zum Gleichgewicht), bzw. 40.000 U/min für 4 h (Sedimentationsgeschwindigkeit) verfolgt, PspF₁₋₂₆₅ bei einem bis 30 µM und 5.000/14.000 U/min (Gleichgewicht) respektive 40.000 U/min (Sedimentationsgeschwindigkeit). Die Komplexbildung von PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ wurde bei den im Ergebnisteil angeführten Konzentrationen und 5.000 U/min (Gleichgewicht) bzw. 40.000 U/min (Sedimenta-

³In Kooperation mit Dr. Hauke Lilie, MLU Halle

tionsgeschwindigkeit) verfolgt. Die Sedimentation von Yjfl wurde bei 22 μ Mund 18.000 (Gleichgewicht) bzw. 40.000 U/min (Geschwindigkeit) gemessen, die von ^WPspA_{160–222} bei 40 μ Mund 20.000 bzw. 40.000 U/min (Gleichgewicht/Geschwindigkeit). Die Detektion erfolgte abhängig von den Proteinen und Zugabe von z.B. Nukleotiden bei den jeweils angegebenen Wellenlängen. Die Daten wurden mittels SedFit (Schuck, 2000) analysiert.

LacZ–Aktivitätstest

Die Aktivität der *psp-lacZ*–Reporterfusionen in den einzelnen Stämmen wurde mittels des klassischen LacZ–Aktivitätstests nach J. H. Miller (1972) durchgeführt. Um auf nicht–oligomerisierende und nicht–membraninteragierende PspA–Fragmente zu selektieren, wurde eine Induktion der pBAD–abhängigen PspA–Fragmentproduktion bereits in der Übernachtskultur mit 0,1 % (w/v) Arabinose induziert. Übernachtskulturen wurden dann auf eine OD von 0,05 in LB mit 0,1 % (w/v) Arabinose verdünnt und für 3 h wachsen gelassen bevor der LacZ–Aktivitätstest durchgeführt wurde. Alle Messungen wurden als Dreifachansatz durchgeführt, die Fehlerbalken in den Abbildungen entsprechen einer Standardabweichung. Zusätzlich wurden in jedem Versuch mehrere intrinsische Kontrollen mitgeführt (mindestens eine pBAD22–Leervektorkontrolle sowie eine entsprechende Positivkontrolle wie PspA_{1–144}– oder WT–YjfJ–produzierende Stämme).

ATPase–Assays

ATPase–Aktivitätsmessungen erfolgten in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl mit 10 mM MgCl₂ in Dreifachansätzen (Balken zeigen eine Standardabweichung). Da PspA_{1–144} PspF_{1–265}–Hexamere extrem stabilisieren kann, wurde PspF_{1–265} vor Zugabe von PspA_{1–144} bei fast finalem Endvolumen (ca. 190–195 μ l bei 200 μ l Endvolumen) für mindestens eine Stunde äquilibriert. Die im Ergebnisteil angegebene Endkonzentration an PspA_{1–144} wurde durch Zugabe hoch–konzentrierter Stammlösung erreicht (ca. 5 μ l), sodass sich das Volumen des Ansatzes durch die PspA–Zugabe nicht nennenswert vergrößerte. Nach einer weiteren Inkubation bei 30 °C (15 Minuten) wurde der Versuch durch Zugabe von 2 mM ATP gestartet, und

Proben nach 2, 5 und 11 Minuten genommen. Die Menge an gebildetem Phosphat wurde mittels des colorimetrischen Malachitgrün-Assays (Lanzetta *et al.*, 1979) in modifizierter Form (Turgay *et al.*, 1997) durchgeführt. Negativkontrollen ohne PspF₁₋₂₆₅ wurden mitgeführt um den Effekt spontaner Hydrolyse des ATP zu berücksichtigen, dieser war aber am Rande der Nachweisgrenze und veränderte die Messergebnisse nicht. Für die Dissoziationsexperimente zur k_{off} -Bestimmung wurden PspA₁₋₁₄₄ (30 μM) und PspF₁₋₂₆₅ (20 μM) für eine Stunde präinkubiert (bei diesen Konzentrationen bilden sich vollständig gesättigte PspA·F-Komplexe). Der ATPase-Assay wurde durch 1:40-Verdünnung in einen bereits 2 mM ATP enthaltenden ATPase-Ansatz gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen (Dreifachansatz). Als Referenz wurden PspA₁₋₁₄₄ (0,75 μM , entspricht 30 μM 1:40 verdünnt) und PspF₁₋₂₆₅ (0,5 μM) wie oben beschrieben mit Prä-Äquilibrierung von PspF₁₋₂₆₅ angesetzt und nach Mischung eine weitere Stunde äquilibriert. Die Hydrolyserate (0,1387 $\frac{\mu\text{M}}{\text{s}}$) diente als Referenz für die folgende numerische Bestimmung des k_{off} (Copeland *et al.*, 2011) unter Verwendung des nls-Algorithmus (200.000 Iterationen) von R (R Core Team, 2013). Da die Dissoziation eine Reaktion erster Ordnung ist, kann die Halbwertszeit über $t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{\text{off}}}$ bestimmt werden (Tummino und Copeland, 2008).

2.2.2 *In-silico*-Arbeiten

Vorhersagen

Coiled-coil-Vorhersagen für PspA (UniProt: P0AFM) wurden mittels COILS-Algorithmus (Lupas *et al.*, 1991) und einem Vorhersagefenster von 21 Aminosäuren (MTIDK-Matrix) für die präziseste Vorhersage von *Coiled-coil*-Start- und Endpunkten (siehe auch (Osadnik, 2009)) durchgeführt. MULTICOILS (Wolf *et al.*, 1997) wurde mit Standardeinstellungen durchgeführt, ebenso wie die *Consensus disorder prediction*⁴.

⁴<http://protease.burnham.org/www/tools/html/introduction.html>

Consensus–Histogramme

Die Sequenzen der PspA/IM30–Familie aus γ –Proteobakterien wurden der Pfam–Datenbank entnommen (Punta *et al.*, 2012). Deutlich zu kurze Sequenzen, denen größere Bereiche der Primärstruktur fehlten wurden verworfen. Innerhalb der verbleibenden 715 Sequenzen wurde die Redundanz mittels Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009) reduziert, um die Überrepräsentation stark untersuchter Gattungen zu unterbinden. Das Consensus–Histogramm wurde daraufhin ebenfalls mit Jalview erstellt. Für das Consensus–Histogramm der gesamten PspA/IM30–Familie wurde die repräsente PFam–RP35–Gruppe für die PspA/IM30–Familie verwendet (165 Sequenzen aus allen Phyla). In allen Consensus–Histogrammen bedeutet 100 eine vollständige Konservierung des Consensus in allen Sequenzen, 0 keine Konservierung.

Modellierung und Simulation

Für den Vergleich der ClpB–MD und PspA_{1–144} wurde das Rückgrat der *coiled–coil*–bildenden Anteile der Proteine (ClpB_{399–513} aus PDB–ID 4HSE; PspA_{27–141}) mittels Swiss–PdbViewer (Guex und Peitsch, 1997) übereinandergelegt, unter Verwendung der Algorithmen *magic fit* und *explore fragment alternative fit*, da das Primärstruktur–Alignment aufgrund der unterschiedlichen Domänenanordnung in beiden Proteinen scheiterte. Die beste Übereinstimmung zeigte eine durchschnittliche Standardabweichung pro Rest (RMSd) von 1,1 Å über 284 Rückgrat–Atome mit einem Score von 68. Dieser *fit* wurde für alle gezeigten Analysen verwendet. Für die Simulationen wurden unkristallisierte Loops von PspF (PDB–ID 2BJW) und PspA mittels *fill loop* in COOT modelliert. Hexameres PspF wurde mittels Galaxy–Gemini (H. Lee *et al.*, 2013) mit Energieminimierung modelliert. Die Orientierung von PspA_{1–144} in PspA·F–Komplexen für die Simulationen erfolgte entweder von Hand in PyMol (Schrodinger, 2010) oder durch Alignment hexameren ClpBs (ebenfalls wie PspF modelliert) und darauffolgendes Alignment der hexameren AAA–1–Domäne von ClpB mit hexamerem PspF, und die Modellierung von PspA in die M–Domäne gemäß der oben gefundenen besten strukturellen Überlagerung

beider *coiled coils*. Die atomistischen Simulationen⁵ (je n=4) wurden mit Gromacs Version 4.6 (Hess *et al.*, 2008) und dem AMBER99SB-ILDN *force field* (Lindorff-Larsen *et al.*, 2010) und TIP4P –Wassermodell durchgeführt. Elektrostatische Wechselwirkungen wurden über die *Particle Mesh Ewald*–Methode berechnet. Eine Simulationbox wurde um die Proteinkomplexe angepasst, die 2 nm Abstand zu der *periodic boundary* erlaubte. Die Temperatur der Simulationen wurde an ein externes Wärmebad von 303 K gekoppelt (*velocity rescale method* mit $\tau_t=0,1$ ps). Der externe Druck war an 1 bar gekoppelt über den Berendsen–Barostat (*compressibility*= $4,5 \times 10^{-5}$ bar⁻¹, $\tau_p= 1,0$ ps). Die Simulationszeit betrug zwischen 129 und 145 ns (138 ns Durchschnitt).

Chemikalien

Alle Chemikalien und Enzyme, deren Herkunft nicht gesondert aufgeführt werden, stammen von AppliChem (Darmstadt), Bachem (Weil am Rhein), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt am Main), (Quiagen (Venlo, NL), Sartorius Stedim (Göttingen) und Sigma Aldrich (Taufkirchen)

⁵Durchgeführt von Dr. H. Jelger Risselada, MPI Göttingen

3 Ergebnisse

3.1 PspA₁₋₁₄₄: Struktur und funktionelle Bereiche der PspF-inhibierenden PspA-Domäne

3.1.1 Identifikation der PspF-inhibierenden Domäne von PspA *in vivo*

Wie in der Einleitung deutlich gemacht wurde, ist die Interaktion von PspA und PspF der zentrale Regulationspunkt im *psp*-System. Bisherige Fragmentierungsstudien auf Basis der PspA-Strukturhypothese von Elderkin *et al.* (2002) zeigten, dass sich die hauptsächliche PspF-Bindedomäne von PspA im Fragment PspA₁₋₁₈₆ befindet (Abb. 5, beige; Elderkin *et al.*, 2005), jedoch ist PspA₁₋₁₈₆ ineffektiver als Vollängen-PspA (PspA₁₋₂₂₂) bezüglich der Inhibierung der PspF-ATPase (Elderkin *et al.*, 2005; Joly *et al.*, 2009). PspA₁₋₁₈₆ wurde für *In-vitro*-Studien nach Ultrazentrifugation mit CHAPS⁶ aus der unlöslichen Fraktion gereinigt, da es überwiegend in jener lokalisiert ist (Elderkin *et al.*, 2005; Jovanovic *et al.*, 2014). Diese Lokalisation könnte sowohl durch Membraninteraktion als auch Aggregation des Fragmentes begründet sein, da es im Gegensatz zu PspA₁₋₂₂₂ keine größeren oligomeren Komplexstrukturen ausbildet, die sonst ebenfalls mit Membranen sedimentieren (Joly *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass PspA₁₋₁₈₆ zwar die für die PspF-Bindung notwendige Domäne enthält, jedoch weitere Determinanten innerhalb des Fragments für seine scheinbare Membranlokalisation und die Störung der PspA-PspF-Interaktion verantwortlich sind. Die PspF-interagierende Domäne von PspA sollte jedoch vornehmlich cytoplasmatisch lokalisiert sein, da die PspF-Bindung keine Membranbindung benötigt.

Für PspA wird aufgrund seiner Primärstruktur ein großer Gehalt an *Coiled-coils* vorhergesagt (Brissette *et al.*, 1991), ähnliche Vorhersagen ergeben sich auch für andere Vertreter der PspA/IM30-Familie (Osadnik, 2009). Daher wurden im

⁶3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat

Rahmen dieser Arbeit zur Identifikation des minimal PspF-interagierenden PspA-Fragments eine Fragmentation auf Basis der *Coiled-coil*-Vorhersage für PspA durchgeführt, die für PspA eine klare Unterteilung in drei *coiled coils* (CC1-3) zeigte (Abb. 5).

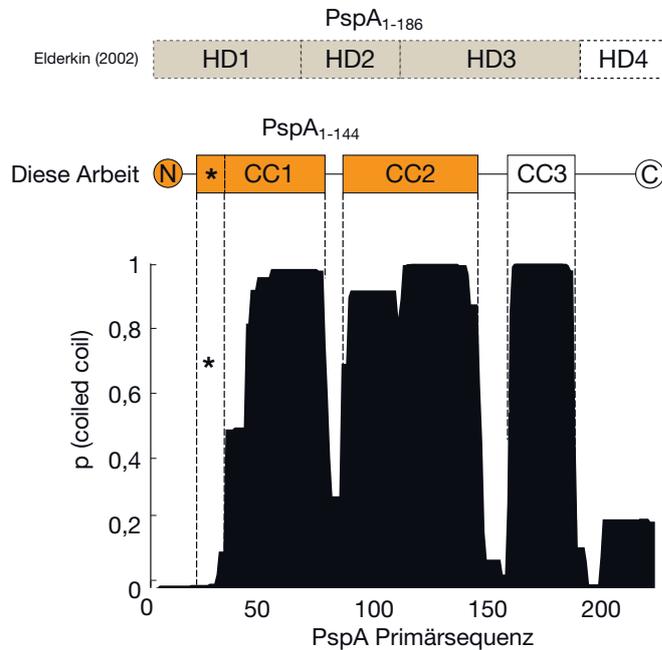


Abbildung 5 PspA besitzt drei *Coiled-coil*-Helices. COILS-Vorhersage (win21) für die Primärsequenz von PspA von *E. coli* mit daraus abgeleiteten *Coiled-coil*-Helices 1-3 (CC1-CC3). Das Fragment PspA₁₋₁₄₄ ist orange hervorgehoben. Zum Vergleich die Strukturvorhersage von Elderkin *et al.* (2002) oberhalb mit PspA₁₋₁₈₆ in beige. Aus Gründen der Einheitlichkeit ist CC1 bereits um den mit * markierten Bereich verlängert, der er in der Kristallstruktur ebenfalls als Teil von CC1 erkennbar ist.

In-vivo-Fragmentationsstudien

Um den PspF-inhibierenden Effekt von PspA-Fragmenten zu untersuchen, wurden LacZ-Aktivitätsstudien mit einem *psp*-Reporterstamm durchgeführt (MC3, Bergler *et al.*, 1994), der zusätzlich zum endogenen *psp*-System eine chromosomal integrierte *pspA-lacZ*-Fusion enthält. Dabei wurde zur Identifikation der minimalen (d.h. nicht membraninteragierenden bzw. oligomerisierenden) PspF-bindenden Domäne auf eine paradoxe Eigenheit des *psp*-Systems zurückgegriffen: Überproduktion von PspA induziert das Psp-System *in vivo* (Yamaguchi *et al.*, 2010; Jovanovic *et al.*, 2006), vermutlich durch die spontane Bildung größerer PspA-Oligomerstrukturen und ihre Membraninteraktion, die die inhibierende Bindung von PspA an PspF

3.1.1 Identifikation der PspF-inhibierenden Domäne von PspA *in vivo*

verhindert (Yamaguchi *et al.*, 2013). Ein ausschließlich PspF-bindendes Fragment sollte unter diesen Bedingungen der Überproduktion also keine Induktion des *psp*-Systems hervorrufen. Daher wurden Fragmente von PspA im *psp*-Reporterstamm über einen längeren Zeitraum produziert (*pBAD*-abhängig, Induktion mit 0,1% Arabinose in der Vorkultur über Nacht sowie in der Hauptkultur) und die durch sie hervorgerufenen Änderungen im Psp-Level bestimmt (Abb. 6). Hierbei zeigte ein Stamm, der Volllängen-PspA produzierte (PspA₁₋₂₂₂), der Erwartung entsprechend eine etwa 3,5-fach erhöhte LacZ-Aktivität (Abb. 6, ganz rechts) im Vergleich zum unbeeinflussten WT-Level (Leervektorkontrolle, gestrichelte Linie).

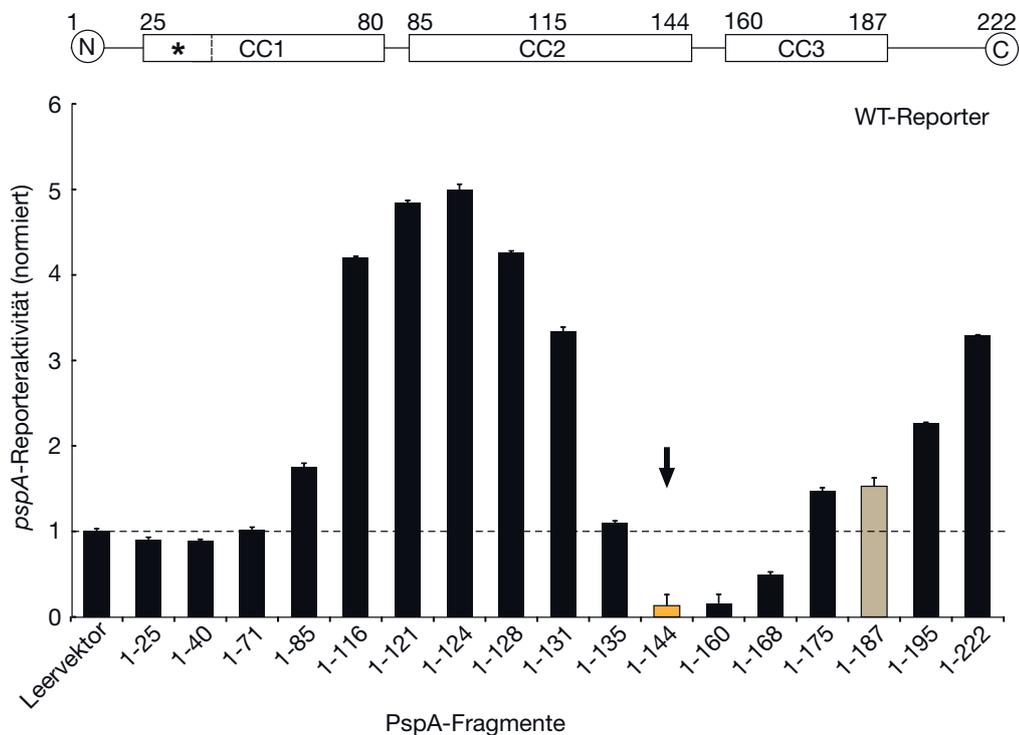


Abbildung 6 PspA₁₋₁₄₄ inhibiert das *psp*-System *in vivo*. Einfluss von PspA-Fragmenten auf die Aktivität einer chromosomalen *pspA-lacZ*-Reporterfusion relativ zum WT-Psp-Level (Leervektorkontrolle, gestrichelte Linie). Die Produktion von PspA₁₋₁₄₄ inhibierte das *psp*-System stark (orange, Pfeil), während Fragmente ohne vollständige CC2 (z.B. PspA₁₋₁₃₁ sowie deutlich längere Fragmente (PspA₁₋₁₈₇, beige) und Volllängen-PspA (PspA₁₋₂₂₂, ganz rechts) das System induzierten.

Im Gegensatz dazu zeigte ein Fragment von PspA (PspA₁₋₁₄₄), welches nur den N-terminalen Bereich sowie die ersten beiden *Coiled-coil*-Domänen enthielt, eine starke Inhibition des *psp*-Systems auf ~10% des WT-Levels selbst nach längerer Überproduktion (Abb. 6, Pfeil; orange hervorgehoben in Abb. 5 und 6]). Eine

leichte Verkürzung des Fragments um 9 Aminosäuren (PspA_{1-135}) hob diese inhibierende Wirkung bereits auf, ebenso wie längere Fragmente, die CC3 oder Teile von ihr enthielten. Unter diesen nicht-inhibierenden Fragmenten war auch PspA_{1-187} (*beige*, quasi identisch mit dem von Elderkin *et al.* (2005) verwendeten PspA_{1-186}), sodass auf Basis der hier gezeigten Fragmentationsstudie PspA_{1-144} als die minimale PspF-inhibierende Domäne von PspA identifiziert werden konnte. Da die gezeigten Untersuchungen mit His-tag-fusioniertem PspA durchgeführt wurden, wurde der Versuch mit einigen His-tag-freien Fragmenten wiederholt, auch hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie zuvor und starke Inhibierung des *psp*-Systems durch PspA_{1-144} (Abb. 7).

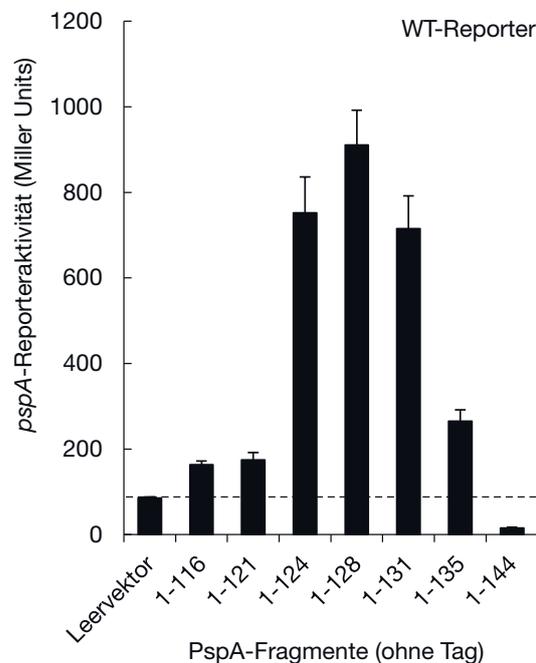


Abbildung 7 Der *psp*-Inhibierende Effekt von PspA_{1-144} ist unabhängig vom His-tag. LacZ-Aktivitäts-Assays mit einem PspA-Fragmente überproduzierenden *psp*-Reporterstamm. Die Fragmente waren nicht mit einem His-tag fusioniert, zeigten aber ähnliche Auswirkungen auf die *psp*-Regulation wie die Fragmente mit His-tag (vgl. Abb. 6).

PspA_{1-144} reguliert das *psp*-System stark und von anderen Psp-Proteinen unabhängig

Die bereits im WT-Reporterstamm deutlichen regulativen Auswirkungen von PspA_{1-144} auf das *psp*-System waren noch weit stärker, wenn ein ΔpspA -Reporterstamm

3.1.1 Identifikation der PspF-inhibierenden Domäne von PspA *in vivo*

verwendet wurde (MC3 $\Delta pspA$), der durch das Fehlen endogenen PspAs zur Regulation des Systems eine 100-fach erhöhte Reporteraktivität zeigte. Hier konnte das Psp-Level durch PspA₁₋₁₄₄ auf 1 % des unregulierten Systems inhibiert werden, während erwartungsgemäß weder ein im WT-Reporterstamm induzierendes, kürzeres Fragment (PspA₁₋₁₁₆), noch Vollängen-PspA (PspA₁₋₂₂₂) einen inhibierenden Einfluss zeigten (Abb. 8a). Es wurde weiterhin deutlich, dass das *psp*-System sehr sensitiv auf das Vorhandensein von PspA₁₋₁₄₄ reagiert, denn die Induktion der *pBAD*-abhängigen PspA₁₋₁₄₄-Produktion mit 0,0005 % Arabinose für drei Stunden reichte bereits aus, um die *psp*-Reporteraktivität um ein Viertel zu senken (Abb. 8b).

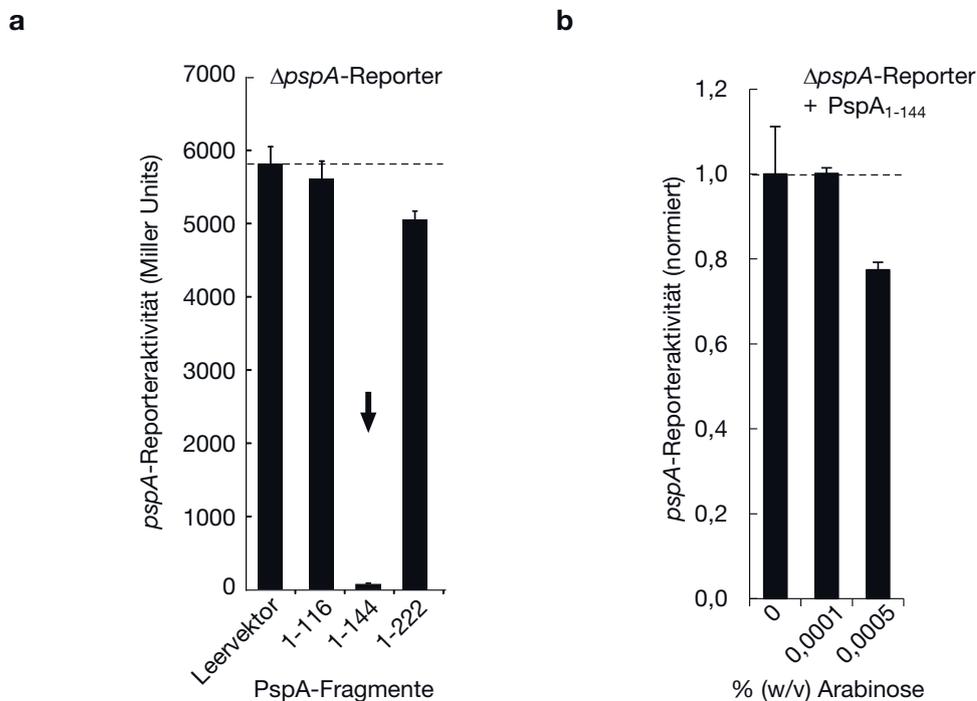


Abbildung 8 Das *psp*-System reagiert stark und sensitiv auf die Produktion von PspA₁₋₁₄₄ in einem $\Delta pspA$ -Reporterstamm. (a) Der LacZ-Aktivitätstest in einem Stamm ohne endogenes PspA (100-fach erhöhte Reporteraktivität) zeigt eine Inhibition des *psp*-Systems auf 1 % durch PspA₁₋₁₄₄, und keine Inhibition durch kürzeres PspA₁₋₁₁₆ oder Vollängen-PspA (PspA₁₋₂₂₂). (b) Bereits die Induktion der PspA₁₋₁₄₄-Produktion mit 0,0005 % (w/v) Arabinose (*pBAD-pspA*₁₋₁₄₄-Vektor) für 3 h führte zu der Inhibition des *psp*-Systems um 25 %.

Darüber hinaus konnte der inhibierende Effekt von PspA₁₋₁₄₄ auch in Reporterstämmen mit Deletionen der für die beiden membranständigen Interaktionspartner von PspA kodierenden Gene *pspB* und *pspC* nachgewiesen werden, ebenso wie in einem $\Delta pspG$ -Reporterstamm (Abb. 9, Pfeile). Nur im $\Delta pspF$ -Stamm, welcher

aufgrund des Fehlens des Aktivators *per se* nur ein minimales (uninduzierbares) Reporterlevel zeigte, hatte PspA₁₋₁₄₄ keinen Effekt, wodurch gezeigt werden konnte, dass der inhibierende Effekt von PspA₁₋₁₄₄ auf das *psp*-System — wie für die PspF-inhibitorische Domäne zu erwarten war — einzig vom Vorhandensein des Aktivators PspF abhängt (Abb. 9b).

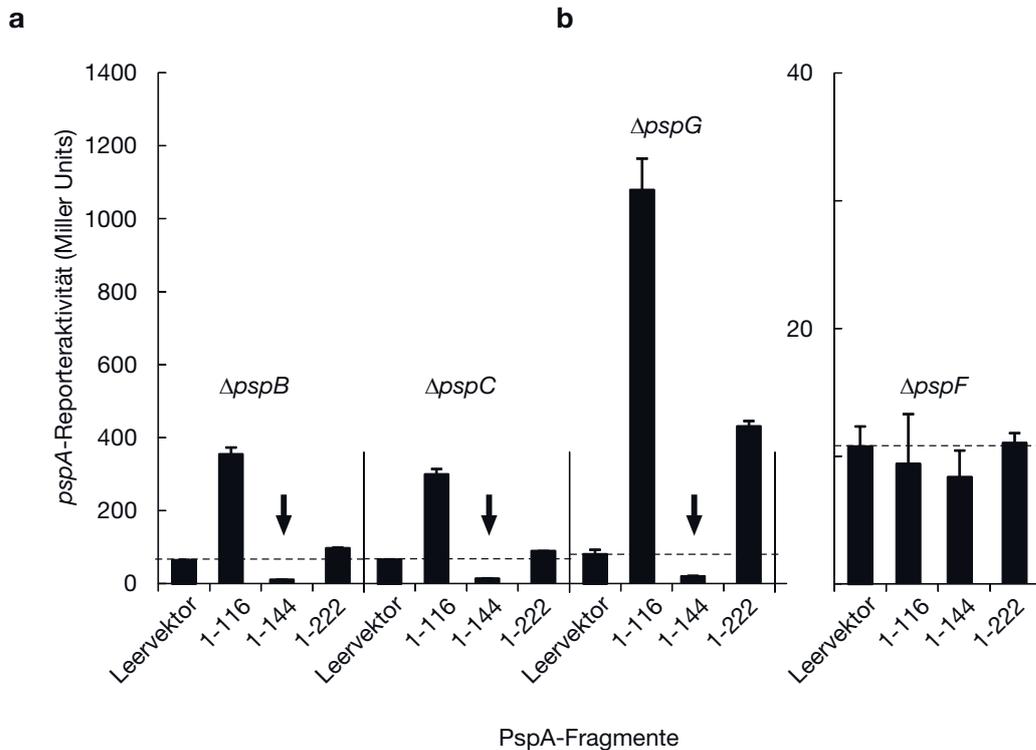


Abbildung 9 Die Inhibition des *psp*-Systems durch PspA₁₋₁₄₄ ist nur von PspF abhängig. (a) LacZ-Aktivitätstests zeigten die Inhibition des *psp*-Systems in verschiedenen Δpsp -Reporterstämmen wenn PspA₁₋₁₄₄ produziert wurde. PspA₁₋₁₁₆ und PspA₁₋₂₂₂ induzierten wie zuvor (Abb. 6). (b) In einem $\Delta pspF$ -Reporterstamm hatte die Produktion von PspA und seinen Fragmenten keine Auswirkung auf das *psp*-Reporterlevel.

PspA₁₋₁₄₄ ist ein rein cytoplasmatisch lokalisiertes, monomeres Protein

Nach der Identifikation von PspA₁₋₁₄₄ wurde seine Lokalisation *in vivo* mittels Ultrazentrifugation von Gesamtzell-Extrakten und anschließender Detektion des Proteins mittels SDS-PAGE/Westernblot, sowie sein Oligomerisationszustand mittels Analytischer Ultrazentrifugation⁷ (AUC) untersucht (zur Reinigung von

⁷In Kooperation mit Dr. Hauke Lilie, Universität Halle-Wittenberg

3.1.2 PspA₁₋₁₄₄ ist ein Coiled-coil-Protein mit konservierter Architektur

PspA₁₋₁₄₄ siehe 3.2.1, S.74). Dabei zeigte sich, dass PspA₁₋₁₄₄ ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert ist (Abb. 10a, links) und sowohl mit anti-PspA- als auch anti-His-Antikörpern als stabiles Protein detektiert werden konnte. Mittels Sedimentationsgleichgewichts-Zentrifugation konnte weiterhin gezeigt werden, dass PspA₁₋₁₄₄ *in vitro* ausschließlich als monomeres Protein vorliegt. Die mangelnde Membraninteraktion sowie die ebenfalls ausbleibende Oligomerisierung des Fragments sind auf der Hand liegende Erklärungen dafür, dass dieses Fragment *in vivo* deutlich besser mit PspF interagieren und dieses inhibieren konnte als die teilweise membranlokalisierten längeren Fragmente wie PspA₁₋₁₈₆.

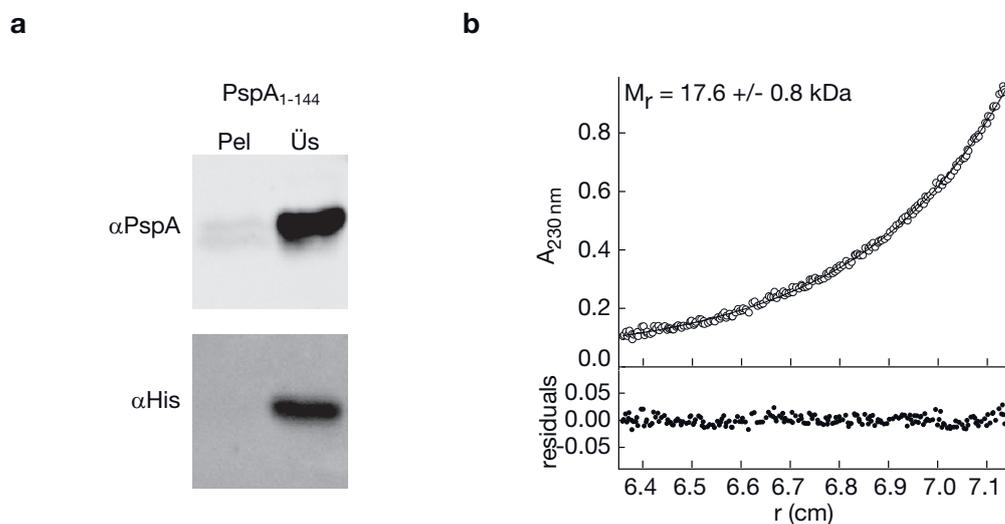


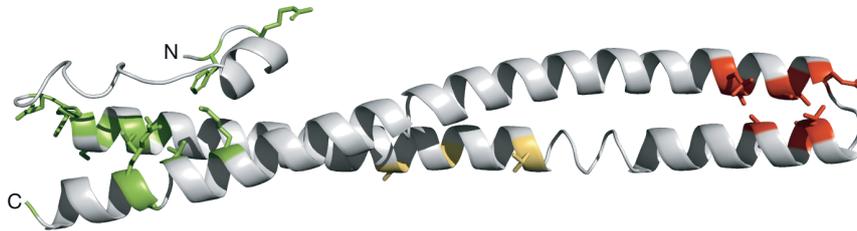
Abbildung 10 PspA₁₋₁₄₄ ist ein cytoplasmatisches, monomeres Protein. (a) PspA war nach Ultrazentrifugation von Gesamtzellextrakt (1 h, 140.000 g) ausschließlich in der löslichen Fraktion detektierbar. Pel-Pelletfraktion, Üs-Löslicher Überstand. Immunodetektion von PspA₁₋₁₄₄ im Westernblot mit anti-PspA-Antikörpern (oben) bzw. anti-His-Antikörpern (unten). (b) Im Sedimentationsgleichgewicht (Analytische Ultrazentrifugation) bildete PspA₁₋₁₄₄ eine distinkte Spezies, deren Größe mit der eines PspA₁₋₁₄₄-Monomers übereinstimmt

3.1.2 PspA₁₋₁₄₄ ist ein Coiled-coil-Protein mit konservierter Architektur

Nach erfolgreicher Identifikation von PspA₁₋₁₄₄ gelang es, dieses Fragment von PspA zu kristallisieren und seine Struktur mit einer Auflösung von 1,8 Å zu

bestimmen⁸ (Abb. 11). Dies ist die erste Kristallstruktur für ein Protein der PspA/IM30-Familie.

a



b

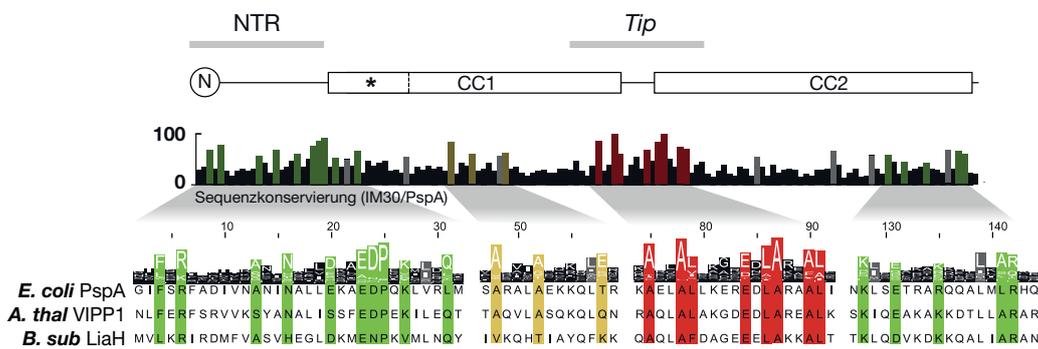


Abbildung 11 Die Kristallstruktur von PspA_{1–144} zeigt, dass die evolutionär konservierten Aminosäuren in PspA für die Bildung zentraler Strukturelemente notwendig sind (a) Die Kristallstruktur von PspA_{1–144} bei 1,8 Å Auflösung. CC1 und CC2 bilden einen anti-parallel *coiled coil* mit einer kurzen *Tip*-Region (rot) und einer lateral zurückfaltenden N-terminalen Region (NTR), die mit konservierten Resten an ebenfalls konservierte Bereiche des *Coiled-coils* bindet (grün). Einige konservierte Aminosäuren unbekannter Funktion sind in der Mitte von CC1 konserviert (gelb). (b) Konservierte Bereiche der PspA/IM30-Familie (Consensus-Histogramm, mitte), zur Orientierung darüber die bereits in Abb. 5 eingeführte Strukturteilung in CC1 und CC2. Konservierte Aminosäuren wie in (a) eingefärbt, dazu Detailansicht der alignierten Sequenzen der konservierten Bereiche der drei Modellproteine PspA, LiaH und VIPP1 (unten).

PspA_{1–144} zeigt sich als langes *Coiled-coil*-Protein, dessen zwei helikalen Domänen (CC1 und CC2) im Bereich der Aminosäuren 25–144 einen langen, anti-parallel, intramolekularen *coiled coil* ausbilden. Der distale Bereich zwischen CC1 und CC2 (~75–91) bildet eine Spitze aus (*Tip*-Region), der N-terminale Bereich (NTR, 3–25) faltet lateral auf den aus CC1 und CC2 gebildeten *coiled coil* zurück (Abb. 11a; die drei Aminosäuren 21–23 zwischen NTR und CC1 konnten nicht kristallisiert werden und wurden in der Abbildung ergänzt). Vergleicht man die Konserviertheit

⁸In Kooperation mit Michael Schöpfel, Christoph Parthier und Milton Stubbs, Universität Halle-Wittenberg

3.1.2 PspA₁₋₁₄₄ ist ein Coiled-coil-Protein mit konservierter Architektur

von Resten bzw. Bereichen der Primärsequenz innerhalb der gesamten PspA/IM30-Familie (Abb. 11b, Mitte) mit ihrer Lage in der Struktur von PspA (farbliche Hervorhebungen) so fällt deutlich auf, dass ein Großteil der konservierten Bereiche in den End- und Übergangsbereichen der von PspA gebildeten Sekundärstrukturen liegen (von der NTR zur *Coiled-coil*-Region, grün, sowie im Bereich CC1–*Tip*–CC2, rot). Eine Ausnahme bilden hier wenige Aminosäuren mittig auf CC1 (gelb), der Grund ihrer Konservierung ist noch unklar. Der ansonsten klare Bezug von evolutionärer Konservierung und Strukturbildung gilt insbesondere für Alanin–Leucin–Paare im hydrophoben Kernbereich des *Coiled-coils* an der *Tip*-Region, welche durch die kleine Seitenkette des Alanins zu einer deutlichen Verjüngung des *Coiled-coils* unmittelbar vor der distalen Spitze führen (Abb. 11a). Die für diese wie auch die anderen Übergangs-Regionen verantwortlichen Aminosäuren sind in den stärker untersuchten Modellproteinen der PspA/IM30-Familie konserviert (PspA von *E. coli*, VIPP1 von *A. thaliana* und LiaH von *B. subtilis*; Abb. 11b, unten), sodass anzunehmen ist, dass die hier gelöste Struktur von PspA die generelle Architektur der PspA/IM30-Proteine widerspiegelt.

Die zurückfaltende N-terminale Region von PspA stabilisiert das Ende der *Coiled-coil*-Region

Während die Existenz der zwei *Coiled-coil*-Helices CC1 und CC2 in PspA aufgrund der COILS-Vorhersagen zu erwarten war (Abb. 5, Osadnik, 2009), ist die rückfaltende N-terminale Region (NTR) ein interessantes konserviertes Strukturmerkmal von PspA, dessen Existenzgrund sich nicht unmittelbar erschließt. Kürzlich wurde für diesen Bereich die Hypothese der Existenz zweier konservierter amphipatischer Helices *ahA* und *ahB* aufgestellt (Jovanovic *et al.*, 2014), für die diverse Funktionen (u.a. Membraninteraktion, Signalerkennung und -weiterleitung) angenommen wurden. Ihre Existenz wurde dabei insbesondere aufgrund der — in Helixprojektion zu erkennenden — breiten, hydrophoben Bereiche ähnlich klassischer amphipatischer Helices postuliert (vgl. Cornell und Taneva, 2006). Aus der Analyse der Kristallstruktur ergab sich jedoch ein deutlich anderes Bild: Wie aus der Struktur von PspA₁₋₁₄₄ zu erkennen war, sind die hoch-konservierten hydrophoben Reste

der NTR zu CC1 hin orientiert (Abb. 12, *pink*; in *a* ist die Lage der Aminosäuren in der Struktur, in *b* eine schematische Ansicht dieses Bereiches und in *c* die Konservierung einzelner Aminosäuren innerhalb der γ -Proteobacteria dargestellt). Sie interagieren mit hydrophoben Aminosäuren auf der Oberfläche von CC1, die lateral aus den hydrophoben Aminosäuren der *Coiled-coil*-Heptaden hervortreten (*orange*). Jene Aminosäuren verbinden damit den von CC1 und CC2 gebildeten, hydrophoben Kernbereich des *Coiled-coils* mit der lateral angelegten NTR und bilden so einen erweiterten hydrophoben Bereich aus (Abb. 12b). Weiterhin interagieren auch einige konservierte Aminosäuren von CC2 mit der NTR, unter ihnen K128 (*türkis*) und L125 (*gelb*; der möglicherweise für die PspC-Interaktion notwendige Rest N14 und sein Interaktionspartner in *blau*, vgl. Diskussion).

Wie die verhältnismäßig schwache Elektronendichte im Bereich der NTR und damit verbundene hohe B-Faktor-Werte in der Struktur zeigten, scheint der Bereich des Übergangs von NTR in CC1 sowie angrenzende Regionen sehr flexibel zu sein (Abb. 13a, *weiße Pfeile*). Die Struktur der kurzen Verbindung von NTR zu CC1 (drei Aminosäuren) konnte aufgrund dessen nicht strukturell gelöst werden. Der Rest des Proteins, insbesondere auch bereits der kurze α -helikale Abschnitt am N-Terminus der NTR (*schwarzer Pfeil*) ist hingegen weniger flexibel. Atomistische Simulationen von PspA bestätigten diese Annahme *in silico* (Abb. 13b) und deuteten darauf hin, dass sich die NTR auch in wässriger Umgebung nicht vom Rest des Proteins löst. Hier zeigte das simulierte PspA₁₋₁₄₄ eine deutliche Flexibilität der NTR und des Übergangs von NTR zu CC1 (Aminosäuren 13-24). Jedoch war deutlich zu erkennen, dass sich die NTR nicht von ihrer lateralen Position am *coiled coil* löste, sondern insbesondere mit dem kurzen α -helikalen Abschnitt (Aminosäuren 5-10) fest auf dem Rest des Proteins verankert blieb. Es ist somit eher unwahrscheinlich, dass die von Jovanovic *et al.* (2014) als amphipatische Helices postulierten Bereiche tatsächlich in der dort angenommenen Weise funktionieren. Die Fehldeutung des Beginns von CC1 als amphipatische Helix rührt daher, dass CC1 zusätzlich zu den für die *Coiled-coil*-Bildung benötigten hydrophoben Resten weitere hydrophobe Aminosäuren für die NTR-Interaktion besitzt, die in helikaler Projektion den

3.1.2 PspA₁₋₁₄₄ ist ein Coiled-coil-Protein mit konservierter Architektur

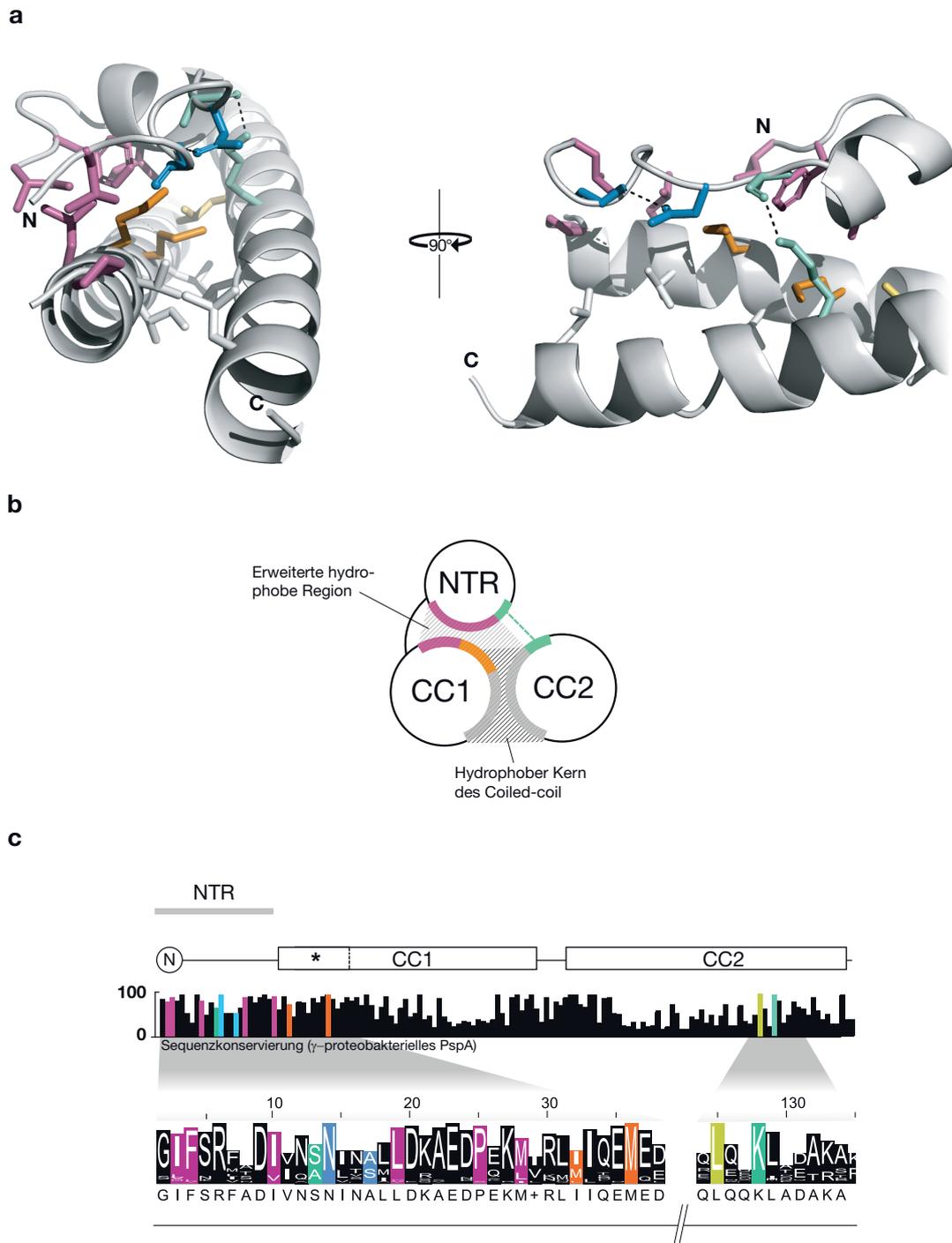


Abbildung 12 Die zurückgefaltete NTR sowie die Enden von CC1 und CC2 bilden einen gemeinsamen hydrophoben Kernbereich. Farbliche Hervorhebungen in allen Bildteilen siehe Haupttext. (a) Detailsicht der NTR in der Kristallstruktur von PspA₁₋₁₄₄. (b) Schematische Darstellung der linken Ansicht aus (a), die den erweiterten hydrophoben Kernbereich durch die Verbindung von NTR und Coiled-coil-Kern illustriert. (c) Consensus-Histogramm von PspA₁₋₁₄₄ (γ -Proteobacteria) mit Detailsicht der NTR/ des Beginns von CC1 sowie dem Ende von CC2.

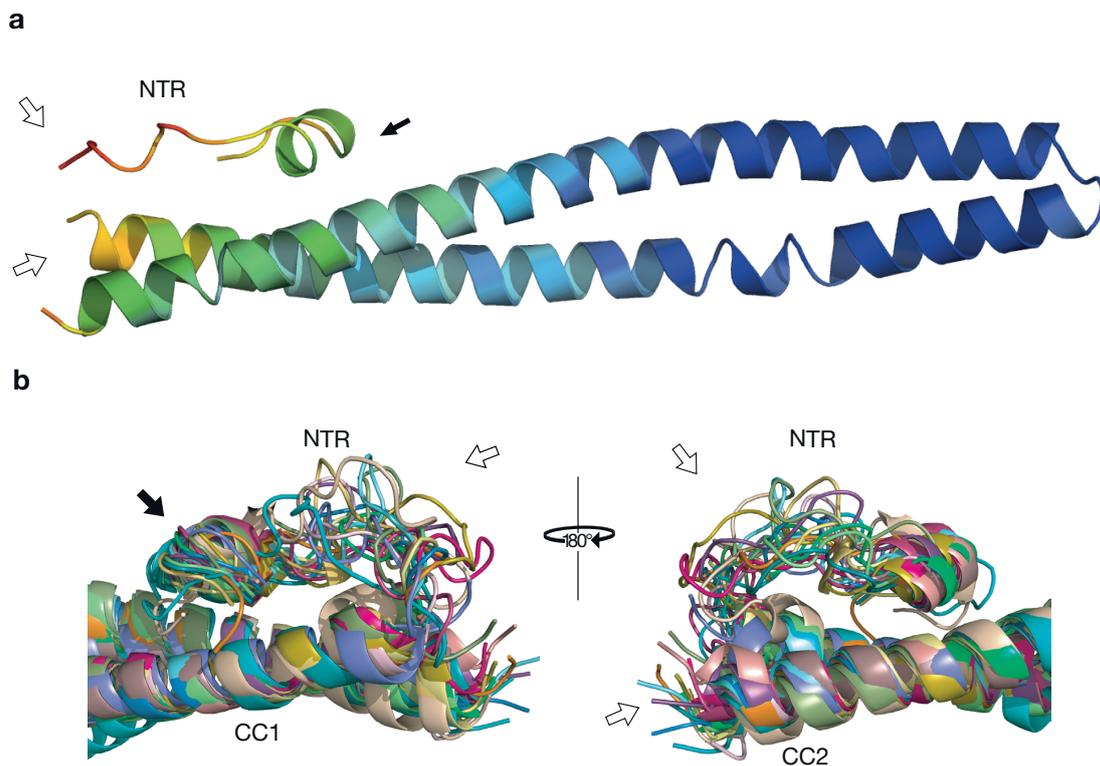


Abbildung 13 Die NTR und der Beginn von CC1 bilden einen stabilen, aber flexiblen Abschluss des *Coiled-coils*. (a) Einföhrung der Kristallstruktur anhand des B-Faktors der Reste. *blau*- hohe Stabilität; *rot*- hohe Flexibilität. Dabei zeigte sich Flexibilität in der Struktur insbesondere am Übergang des *Coiled-coils* zur NTR (*weiße Pfeile*), wohingegen der helikale Bereich der NTR stabil an CC1 lag (*schwarzer Pfeil*). (b) Auch atomistische Simulationen ($n=19$) von PspA₁₋₁₄₄ zeigten nach 18 ns simulierter Zeit die hohe Flexibilität von NTR im Bereich des Übergangs zu CC1, während der kurze helikale Bereich der NTR auf CC1 fixiert war. Proteine verschieden gefärbt und aligniert in der CC1/NTR-Region, Pfeile wie in (a).

3.1.2 PspA₁₋₁₄₄ ist ein Coiled-coil-Protein mit konservierter Architektur

Anschein einer amphipathische Helix erwecken. Diese zusätzlichen hydrophoben Aminosäuren sind auch der Grund, aus dem in der COILS –Vorhersage der Beginn von CC1 nicht als *coiled coil* vorhergesagt werden konnte (vgl. Abb. 5).

Um den Einfluss der NTR auf die im Rahmen dieser Arbeit im Fokus stehenden regulierenden Interaktionen von PspA mit PspF zu beleuchten, wurden Fragmente von PspA₁₋₁₄₄ hergestellt, in denen der N-Terminus sukzessive verkürzt wurde, sodass das PspA-Fragment in seiner kürzesten Version keine NTR mehr besaß (PspA₂₆₋₁₄₄). Wie bereits zuvor wurden die Effekte dieser Verkürzungen auf die Regulation des *psp*-Systems mittels LacZ-Reporterassays untersucht (Abb. 14). Hier zeigte sich ein heterogenes Bild: Während das vollständige Fehlen der NTR

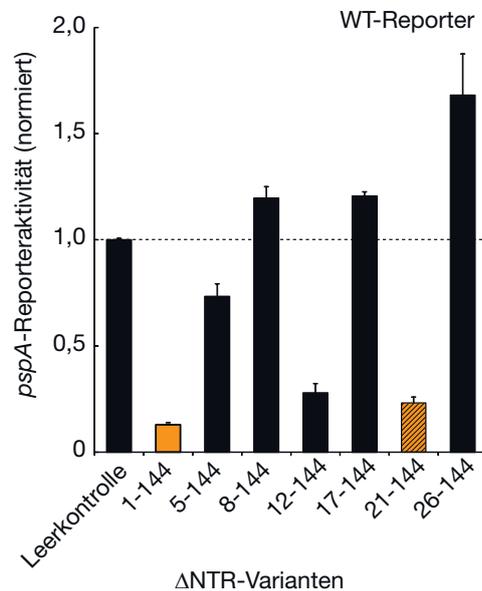


Abbildung 14 Verkürzungen der NTR haben divergente Effekte auf die *psp*-Inhibition *in vivo*. LacZ-Aktivitätsassays wie zuvor (Abb. 6), hier mit Δ NTR-Varianten im WT-*psp*-Reporterstamm. Die Verkürzung von PspA₁₋₁₄₄ um die komplette NTR (PspA₂₆₋₁₄₄) führte zu einer Induktion des *psp*-Systems (ganz rechts, die gestrichelte Linie gibt das natürliche Psp-Level in der Leervektorkontrolle an). Kürzere Fragmente hatten teilweise noch inhibierende Effekte, selbst PspA₂₁₋₁₄₄ (*orange-schwarz schraffiert*) inhibierte das *psp*-System noch nahezu wie PspA₁₋₁₄₄ (*orange*).

in PspA₂₆₋₁₄₄ aufgrund gestörter regulatorischer Funktionalität zur Induktion des *psp*-Systems führte, war das etwas längere Fragment PspA₂₁₋₁₄₄ noch in der Lage, vergleichbar zu PspA₁₋₁₄₄ in der Inhibition des Systems zu wirken, wenn auch mit leicht schlechterer Effizienz (~ 2 -faches Reporterlevel, Abb. 14, *orange schraffiert*). Da jedoch längere Fragmente sowohl teilweise induzierende wie auch

inhibierende Effekte auf die *psp*-Regulation zeigten, ist anzunehmen, dass bei der Wirkung N-terminal verkürzter PspA-Fragmente sekundäre Effekte wie Stabilität gegenüber Proteolyse, Aggregationsanfälligkeit etc. eine maßgebliche Rolle spielen. Da innerhalb der Reporteraktivitätsstudien mit stark überproduziertem PspA gearbeitet wurde, können instabile Proteine verstärkt aggregieren oder — im gegenteiligen Fall — eine erhöhte Proteolyseanfälligkeit der Fragmente durch die vergleichsweise hohe Produktionsrate der Proteine maskiert werden.

Zusammenfassend lässt sich daher auf Basis der vorliegenden Daten schlussfolgern, dass die NTR im strukturell hochkonservierten PspA₁₋₁₄₄ *in vivo* vermutlich eine Rolle in der Stabilisierung des Proteins gegenüber Abbau/Entfaltung einnimmt, indem ein ansonsten exponierter N-Terminus lateral auf dem strukturell stabilen *coiled coil* fixiert wird.

3.1.3 *In-vivo*-Identifikation der PspF-Binderegion 1 (FBR1) auf CC1

Auf Grundlage der gelösten Struktur von PspA₁₋₁₄₄ sollten Bereiche auf PspA identifiziert werden, die von zentraler Bedeutung für die PspA-PspF-Interaktion sind. Dazu wurden einzelne Aminosäuren von PspA₁₋₁₄₄ zumeist gegen Alanin ausgetauscht, und der Effekt dieser Austauschere auf die Reporteraktivität *in vivo* bestimmt.

Hierbei galt der Fokus zunächst den konservierten Aminosäuren 20–40 im N-terminalen Bereich von CC1, da die Konservierung anderer Aminosäurebereiche von PspA₁₋₁₄₄ größtenteils auf die strukturelle Wichtigkeit ihrer Reste in der Ausbildung der *Tip*-Region und der Bindung des rückfaltenden N-Terminus zurückzuführen war (vgl. Abb. 11; einen vollständigen Überblick über die Strukturmerkmale von PspA₁₋₁₄₄ sowie ein vergleichendes Consensus-Histogramm bietet Abb. 21, S.73). PspA₁₋₁₄₄-Varianten mit einzelnen Aminosäureaustauschen wurden wie zuvor in einem *psp*-Reporterstamm produziert. Um dabei sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte auf das Reporterlevel ausschließlich auf die PspA₁₋₁₄₄-PspF-Interaktion zurückzuführen sind, wurden diese Versuche in Δ *pspA*-Reporterstämmen ohne endogenes PspA durchgeführt. Aufgrund des star-

3.1.3 *In-vivo*-Identifikation der PspF-Binderegion 1 (FBR1) auf CC1

ken Effekts von PspA₁₋₁₄₄ vor diesem Stammhintergrund (Regulation des Reporters auf 1 % der unregulierten Aktivität) versprach dieser Ansatz zugleich eine hohe Sensitivität gegenüber Veränderungen in der PspA-PspF-Interaktion.

Austausche in der hydrophoben Kernregion schwächen die PspF-Interaktion vermutlich durch Destabilisierung

Für einige der PspA₁₋₁₄₄-Varianten konnte eine etwa 10 bis 25-fach erhöhte *psp*-Reporteraktivität gezeigt werden (Abb. 15a, b zeigt die Positionen der ausgetauschten Aminosäuren in PspA₁₋₁₄₄), was die Bildung einer PspF-bindenden Region (FBR1) durch die ausgetauschten Aminosäuren wahrscheinlich macht. Unter den *Loss-of-regulatory-function*-Varianten waren mit PspA₁₋₁₄₄^{I33S} und PspA₁₋₁₄₄^{M36A} (*purpur*) auch zwei Varianten, in denen hydrophobe, mit CC2 interagierende Aminosäuren ausgetauscht waren. Eine direkte Involvierung dieser Aminosäuren in die PspF-Interaktion ist unwahrscheinlich, ihr Inhibitions-schwächender Effekt liegt vermutlich in der strukturellen Destabilisierung des PspF-interagierenden Bereichs begründet, da sich eine Destabilisierung dieser Region auch auf die oberflächlich lokalisierten PspF-interagierenden Aminosäuren auswirkt. Als Bestätigung dieser Annahme kann geltend gemacht werden, dass ähnliche Inhibitions-aufhebende Effekte bereits durch die weiter oben angeführten Verkürzungen von PspA₁₋₁₄₄ sowohl im C-terminalen (z.B. PspA₁₋₁₂₈, Abb. 6) als auch N-terminalen Bereich (PspA₂₆₋₁₄₄, Abb. 14; beide Verkürzungen in Abb. 15b als purpurfarbene Sekundärstrukturen hervorgehoben) hervorgerufen wurden, und diese destabilisierenden Verkürzungen wie auch I33S und M36A denselben Bereich von PspA₁₋₁₄₄ betreffen.

Austausche auf der Oberfläche von PspA führen zu stark geschwächter PspF-Inhibition

Unter den auf der Oberfläche von PspA lokalisierten Aminosäuren zeigten ebenfalls einige Aminosäureaustausche deutliche Effekte auf die PspF-abhängige *psp*-Regulation (z.B. E37A, *hellrot* in Abb. 15a), während andere kaum einen Einfluss auf die *psp*-Regulation zeigten (z.B. Q34A, *grau*). Da der konservierte Rest Q136

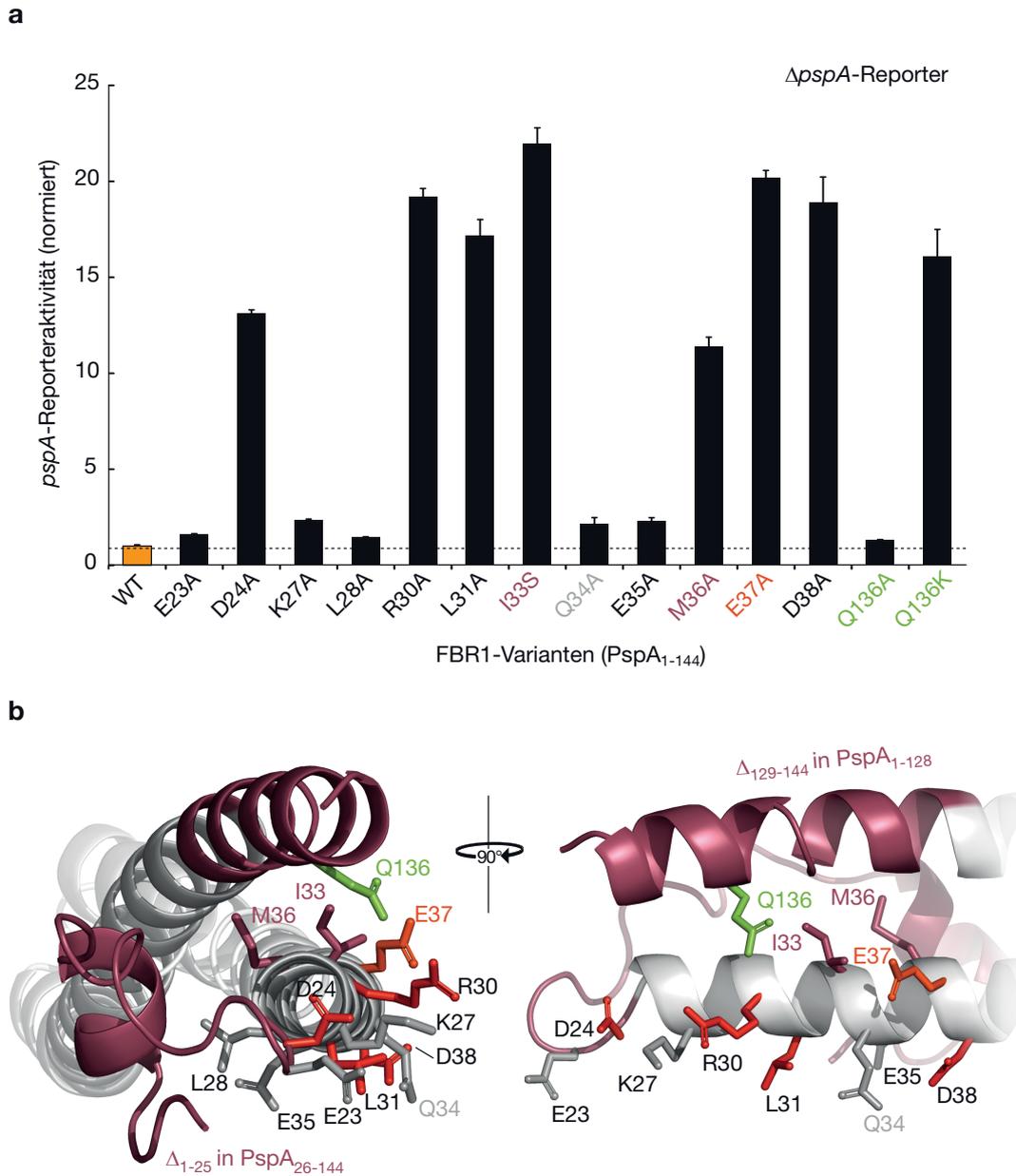


Abbildung 15 *In-vivo*-Identifikation der PspF-Binderegion 1 (FBR1). (a) Veränderung der *pspA*-Reporteraktivität im Δ *psp*-Reporterstamm durch Aminosäureaustausche in PspA₁₋₁₄₄. Normiert auf das durch WT-PspA₁₋₁₄₄ inhibierte Psp-Level (WT, orange und gestrichelte Linie). *Purpur*- Austausche in der hydrophoben Kernregion; *grau*- Q34A-Austausche mit schwachem Effekt auf das Psp-Level; *orange-rot*- E37A-Austausch mit starkem Effekt auf das Psp-Level; *grün*- Austausche in CC2; für nähere Erläuterung siehe Haupttext. (b) Lage der Austauschpositionen in PspA (*sticks*-Darstellung). Farben wie in (a), zusätzlich alle weiteren Positionen, deren Austausch starke Effekte auf die *psp*-Inhibition zeigten in *rot*, bzw. *grau* bei schwachem Effekt; Sekundärstrukturelemente, deren Entfernung den gleichen Effekt hatte wie Einzelaustausche im hydrophoben Kern in *purpur*.

3.1.3 *In-vivo*-Identifikation der PspF-Binderegion 1 (FBR1) auf CC1

(grün) auf CC2 in der Nähe der schwächer inhibierenden R30, und E37 liegt und damit ebenfalls einen möglichen Einfluss auf die PspF-Interaktion besitzt, wurde auch er gegen Alanin ausgetauscht, um die Rolle der CC2 in der PspF-Interaktion näher zu beleuchten. Dieser Austausch zeigte keinen Effekt auf die PspF-Regulation, im Gegensatz zu dem anschließenden Einbringen einer Ladung an dieser Stelle (Q136K). Erst dieser Austausch hatte einen ähnlich starken Effekt wie die Austausche R30A/E37A in CC1, was auf eine untergeordnete Rolle von CC2 in der PspF-Interaktion hindeuten könnte. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass selbst Austausche von Oberflächen-Aminosäuren von PspA, deren direkter Kontakt mit PspF aufgrund ihrer Lage wahrscheinlich ist, nur indirekt auf die PspF-Interaktion wirken können. So könnte z.B. durch das Einbringen oder Entfernen von Ladungen interne Salzbrücken stabilisiert bzw. destabilisiert oder sonstige Effekte auf die Proteinstruktur induziert werden. Dies mag für einige der Austausche tatsächlich eine Rolle spielen, ist jedoch als alleiniger Grund für die beobachteten Effekte aller Einzelaustausche nicht wahrscheinlich. Die im späteren Verlauf dieser Arbeit beschriebenen *In-vitro*-Studien mit PspA₁₋₁₄₄-Varianten bestätigen dies.

Die durch PspA₁₋₁₄₄-Varianten erhaltenen Veränderungen des Psp-Expressionslevels konnten qualitativ auch mit Vollängen-PspA (PspA₁₋₂₂₂) nachgewiesen werden (Abb. 16; E37A induziert stärker als Q34A), sodass die mit der isolierten PspF-Bindedomäne gemessenen Ergebnisse die Funktion der Domäne innerhalb des PspA₁₋₂₂₂ widerspiegeln. Hierbei musste wieder mit einem WT-Reporterstamm mit endogenem PspA gearbeitet werden (PspA₁₋₂₂₂ reprimiert den Reporter im $\Delta pspA$ -Stamm nicht, Abb. 8), in dem aufgrund der vermutlichen PspA₁₋₂₂₂-Oligomerisierung und -Membranlokalisation bei Überproduktion sowie der Interaktion des endogenen WT-PspAs und der PspA-Varianten etliche PspA-PspF-interaktionsunabhängige Effekte das System beeinflussten, sodass diese Versuche zwar als Bestätigung der Interpretationen für die weitaus präziser auswertbaren PspA₁₋₁₄₄-Versuche im $\Delta pspA$ -Stamm herangezogen, jedoch Ansätze mit

PspA_{1–222} nicht weiter verfolgt wurden.

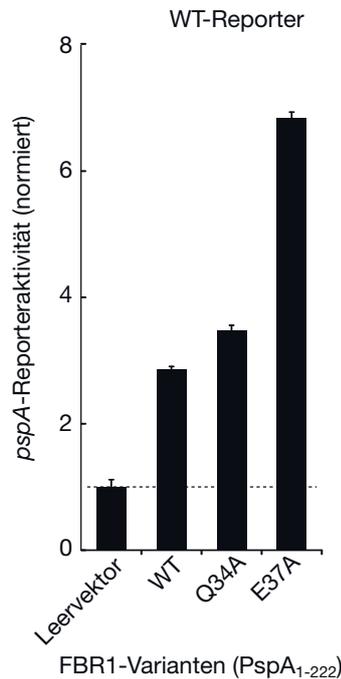


Abbildung 16 FBR1–Austausche wirken in PspA_{1–222} ähnlich wie in PspA_{1–144}. Messung der Reporteraktivität eines *psp*–Reporterstammes wie zuvor (vgl. Abb. 6). Austausche Q34A und E37A hatten einen geringen (Q34A) bzw. stark erhöhenden (E37A) Einfluss auf das Psp–Level relativ zu WT–PspA_{1–222}, wie bereits für PspA_{1–144} gezeigt (vgl. Abb. 15).

Ein langgestreckter Bereich von PspA bildet die FBR1

Interessanterweise konnte trotz starker Auswirkungen einzelner Austausche auf die *psp*–Regulation kein Rest identifiziert werden, dessen alleiniger Austausch die Interaktion mit PspF vollständig unterbindet, da dies ein etwa 100–faches Ansteigen der Reporteraktivität zur Folge gehabt hätte. Selbst im Falle von E37A war das Psp–Level jedoch „nur“ etwa 22–fach erhöht, sodass die Interaktion mit PspF zwar geschwächt wurde, aber immer noch stattgefunden haben muss, und somit vermutlich mehrere Reste auf der Oberfläche von PspA für die PspF–Interaktion verantwortlich sind. Diese Annahme wird von der Tatsache untermauert, dass sich der Bereich mutierter Reste, welche die PspF–Interaktion schwächen, in der PspA–Struktur über eine Distanz von 21 Å erstreckt (D24 bis D38), was es wahrscheinlich

3.1.4 Eine zweite PspF-Binderegion (FBR2) reguliert die PspA-Aktivität

macht, dass dieser Bereich eine langgestreckte Region zur Interaktion mit PspF konstituiert (FBR1).

3.1.4 Eine zweite PspF-Binderegion (FBR2) reguliert die PspA-Aktivität

Da mit der Identifikation von FBR1 deutlich wurde, dass ein verlängerter Bereich auf PspA für die PspF-Interaktion verantwortlich sein musste, wurde PspA auf weitere PspF-Interaktionsbereiche hin untersucht. Da PspF ein quasi ausschließlich proteobakterielles bEBP ist, und dort insbesondere gehäuft in γ -Proteobacteria vorkommt (Francke *et al.*, 2011), wurden mögliche PspF-Interaktionsbereiche auf PspA *in silico* unter der Prämisse gesucht, dass die in ihnen enthaltenen Aminosäuren in den PspAs der γ -Proteobacteria deutlich konserviert sein sollten, ihr Konservierungsgrad innerhalb der gesamten PspA/IM30-Familie hingegen nur schwach sein sollte. Mit diesem Ansatz konnten zwei Aminosäuren, K55 und R59, auf CC1 *in silico* identifiziert werden (Abb. 17a, siehe auch hier zur Übersicht Abb. 21 S.73). Diese beiden Reste zeichnen sich dadurch aus, dass sie in einer Linie mit den zentralen Aminosäuren der FBR1 auf CC1 ausgerichtet sind (Abb. 17b), sodass die gleichzeitige Interaktion von FBR 1 und K55/R59 mit PspF von einem strukturellen Standpunkt aus möglich ist.

Auch hier wurden wieder Einzelaustausche der Aminosäuren durchgeführt, und die Effekte der entstandenen PspA₁₋₁₄₄-Varianten auf den *psp*-Reporter überprüft. Austausch der Aminosäure K55 gegen Alanin oder Glutamat zeigten einen leicht induzierenden Effekt im WT-Reporterstamm und der Austausch K55E einen deutlicheren Anstieg des Reporterlevels (~ 4 -fach) im Δ *pspA*-Stamm, welcher deutlicher war als der schwach induzierender Varianten von FBR1 (bis 2-faches Reporterlevel), jedoch nicht die Dimensionen der starken Austausche (R30A, E37A) in FBR1 erreichte (Abb. 18).

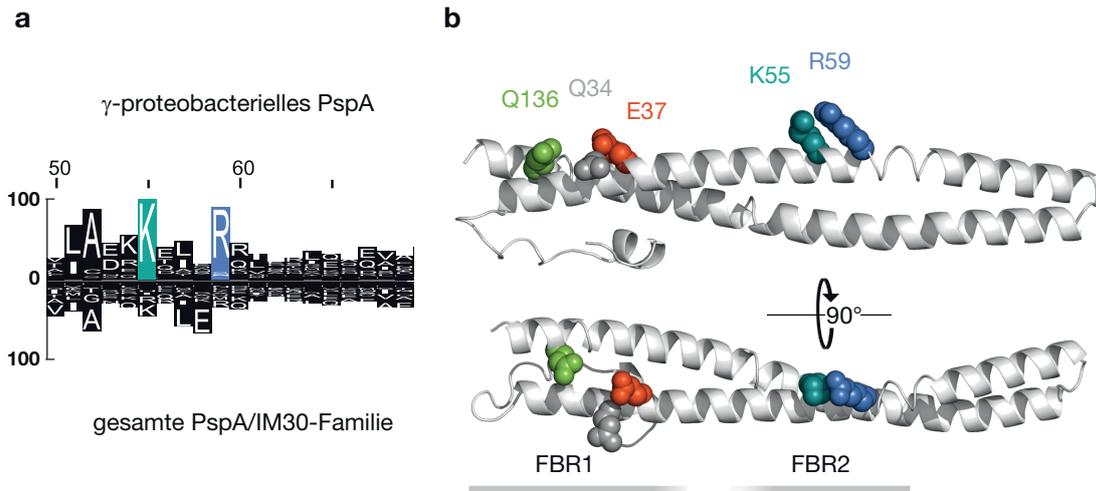


Abbildung 17 Reste der potentiellen PspF-Binderegion 2 (FBR2) sind konserviert und in gleicher Richtung wie FBR1 orientiert. (a) Ausschnitt des vergleichenden Consensus-Histogramms für PspA (vgl. Abb. 21). Die Reste K55 und R59 sind in γ -Proteobacteria stark konserviert (oben), jedoch nicht in der gesamten PspA/IM30-Familie (unten), was ein Hinweis auf ihre mögliche Rolle in der PspF-Regulation sein könnte. (b) Lage und Orientierung der beiden FBR2-Reste im Vergleich zu FBR1. FBR1 und FBR2 sind auf auf derselben Seite von PspA in dieselbe Richtung orientiert, sodass eine gleichzeitige PspF-Interaktion von FBR1 und FBR2 möglich ist.

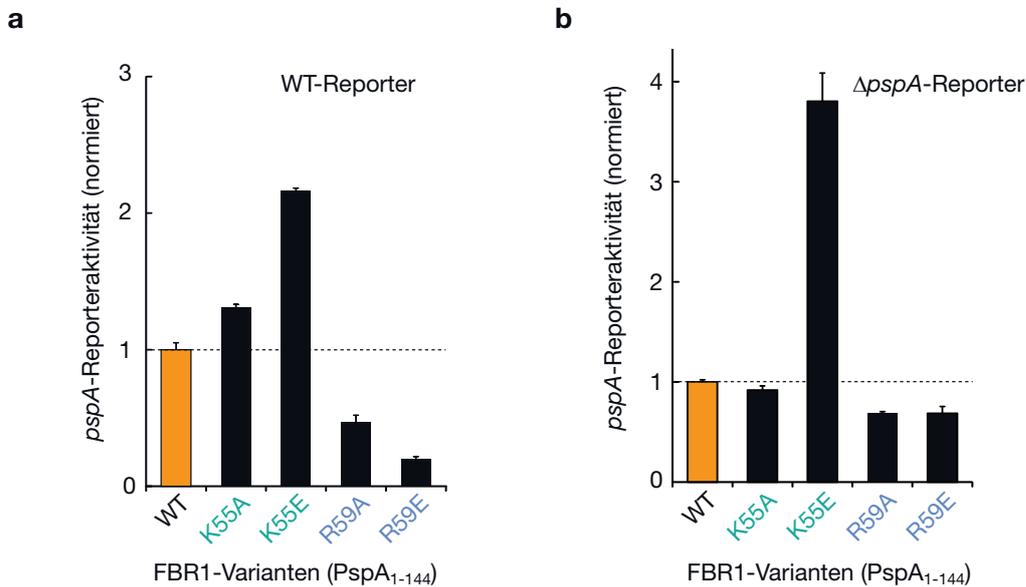


Abbildung 18 Der Austausch von R59 führt zu einem *Gain-of-inhibitory-function* von PspA₁₋₁₄₄. LacZ-Aktivitätsstudien mit FBR1-Austauschvarianten von PspA₁₋₁₄₄ (a) im WT-Reporterstamm und (b) im Δ pspA-Reporterstamm, normiert auf die Inhibition durch WT-PspA₁₋₁₄₄ (orange, gestrichelte Linie). Während K55-Austausche leicht induzierend wirkten, wurde das *psp*-System durch R59-Austauschvarianten besser inhibiert als durch PspA₁₋₁₄₄.

Austausche von R59 führen zu einem *gain of inhibitory function*

Weitaus interessanter waren in dieser Region Austausche von R59, die schon im Falle des R59A-Austausches sowohl im WT- (Abb. 18a) als auch im $\Delta pspA$ -Reporterstamm (b) zu einer stärkeren Inhibition von PspF (und damit Senkung des *psp*-Reporterlevels) führten, als es durch WT-PspA₁₋₁₄₄ der Fall war. Im $\Delta pspA$ -Stamm entsprach die Regulation durch PspA₁₋₁₄₄^{R59A} einer 130-fachen Inhibition des unregulierten Reporters. Dies ist die einzige in dieser Arbeit charakterisierte Position von PspA, für die ein derartiger *Gain-of-inhibitory-function*-Effekt gezeigt werden konnte. Für den PspA₁₋₁₄₄-Austausch R59E konnte in Messungen im WT-Reporterstamm eine noch stärkere Inhibition als durch PspA₁₋₁₄₄^{R59A} gezeigt werden (Abb. 18a), dort lag die Reporteraktivität bei dem 0,2-fachen des bereits WT-PspA₁₋₁₄₄-inhibierten Levels, und damit an der Nachweisgrenze des LacZ-Assays (< 3 Miller Units). Dieser Austausch zeigte im $\Delta pspA$ -Stamm keine weitere Senkung des Reporterlevels.⁹ Aufgrund der Konserviertheit und Lage der Reste K55/R59 sowie des inhibierenden Effekts der R59-Mutationen kann auch im Falle dieses Bereichs angenommen werden, dass er eine Rolle in der Regulation der PspF-Aktivität spielt, sodass die Reste um K55/R59 wahrscheinlich eine zweite PspF-Binderegion (FBR2) bilden.

3.1.5 Aminosäuren in der *Tip*-Region beeinflussen die PspF-Regulation leicht

Nachdem die für die strukturellen Merkmale NTR, *Tip*, den *Coiled-coil* aus CC1 und CC2 sowie die für die regulatorisch wichtigen FBR1/FBR2 verantwortlichen

⁹Da der *Gain-of-inhibitory-function*-Effekt des R59-Austausches sowohl im WT- als auch im (zuvor meist verwendeten) $\Delta pspA$ -Reporterstamm deutlich gezeigt werden konnte, und dies die zentrale Aussage dieser Experimente darstellt, wird auf eine detaillierte Analyse der unterschiedlichen Stärke des Effekts vor den verschiedenen Stammhintergründen verzichtet. Generell wurden alle LacZ-Messungen der Effekte von Aminosäureaustauschen jeweils in WT- und $\Delta pspA$ -Stämmen und mit Varianten von PspA₁₋₁₄₄ und PspA₁₋₂₂₂ sowie weiterer Fragmenten durchgeführt. Die durchgängig sichtbare Tendenz war, dass leichte Erhöhungen (oder Senkungen der LacZ-Aktivität im Fall von R59-Austauschen) im WT-Reporterstamm besser differenziert werden konnten als im $\Delta pspA$ -Stamm, in dem insbesondere Effekte starker Aktivierung quantitativ deutlicher differenziert werden konnten als im WT-Stamm. Die hier entscheidenden qualitativen Aussagen (Repression/schwache oder starke Induktion) blieben davon unberührt.

3.1.5 Aminosäuren in der *Tip*-Region beeinflussen die *PspF*-Regulation leicht

D85R). Im Falle der apikalen E84 und D85 wurden zusätzlich die Austausche E84Q, D85N sowie der Doppelaustausch ED84QN durchgeführt, um mögliche Effekte durch die Größenveränderung der Seitenketten, die im Loop die hydrophobe Endfläche des *coiled coil* abdecken, zu vermeiden. In Voruntersuchungen im WT-Reporterstamm zeigten sich größtenteils nur marginale Effekte der Austausche auf die *psp*-Regulation, auch durch „harte“ Austausche wie D58R (unveröffentlichte Daten). Nur zwei Varianten, $\text{PspA}_{1-144}^{\text{D85N}}$ und $\text{PspA}_{1-144}^{\text{ED84QN}}$, zeigten eine etwas stärker erhöhte *psp*-Reporteraktivität, sodass mit ihnen weitere Untersuchungen im ΔpspA -Reporterstamm durchgeführt wurden (Abb. 20). Auch hier hatten

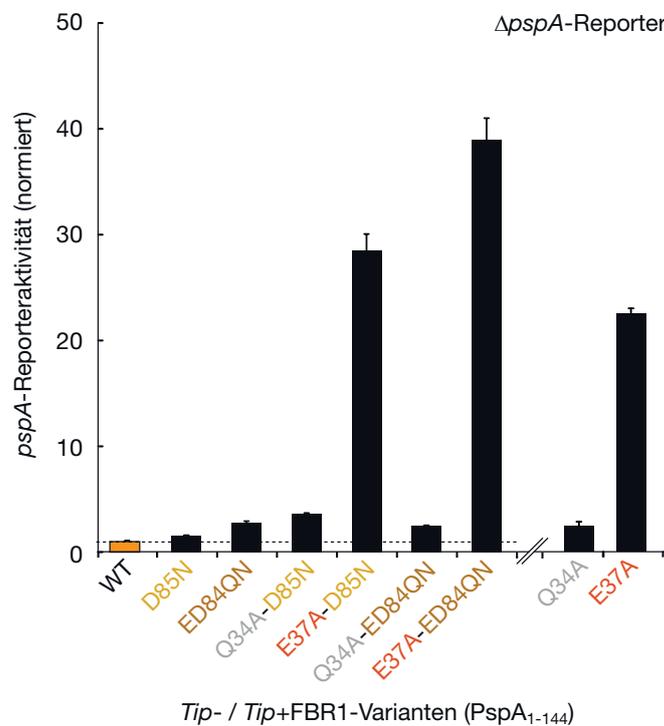


Abbildung 20 *Tip*-Austausche verstärken den *psp*-Inhibitionsverlust der $\text{PspA}_{1-144}^{\text{E37A}}$ -Variante. *LacZ*-Aktivitätsmessungen des ΔpspA -Reporterstamms. Die Austausche D85N und ED84QN veränderten das PspA_{1-144} -inhibierte *Psp*-Level nur leicht (links, vgl. mit WT- PspA_{1-144} in orange). Sie verstärkten den Effekt von E37A (starker Inhibitionsverlust), hatten jedoch kaum Effekte auf Q34A (schwacher Inhibitionsverlust). Zum Vergleich ist rechts der Einfluss der FBR1-Einzelaustausche aus Abb. 15 gezeigt.

$\text{PspA}_{1-144}^{\text{D85N}}$ und $\text{PspA}_{1-144}^{\text{ED84QN}}$ nur eine leichte Erhöhung der Reporteraktivität zur Folge (weniger als $\text{PspA}_{1-144}^{\text{K55E}}$ in FBR2), wobei die Induktion durch $\text{PspA}_{1-144}^{\text{ED84QN}}$ leicht stärker als durch $\text{PspA}_{1-144}^{\text{D85N}}$ war. Wurden diese *Tip*-Austausche jedoch zusammen mit dem stark induzierenden Austausch E37A in PspA_{1-144} eingeführt

3 Ergebnisse

(PspA₁₋₁₄₄^{E37A-D85N} und PspA₁₋₁₄₄^{E37A-ED84QN}), so führten sie zu einer sichtbaren Erhöhung der Reporteraktivität relativ zu PspA₁₋₁₄₄^{E37A} mit WT-*Tip*-Region. Wurde statt E37A der Austausch Q34A eingeführt (der kaum induzierend auf das *psp*-System wirkt), blieben auch die Doppelaustausche (PspA₁₋₁₄₄^{Q34A-D85N} und PspA₁₋₁₄₄^{Q34A-ED84QN}) erwartungsgemäß ohne nennenswerten Effekt. Aufgrund der eher multiplikativen als additiven Effekte von E37A und D85N oder ED84QN ließe sich spekulieren, dass FBR1 und die *Tip*-Region unabhängig voneinander in der *psp*-Regulation wirken. Aufgrund dessen und der nur marginalen Effekte der *Tip*-Austausche auf die *psp*-Regulation sowie ihre Lage im Protein (von FBR1/FBR2 entfernt und auf der gegenüberliegenden Seite des *Coiled-coils* orientiert) scheint es wahrscheinlich, dass die *Tip*-Region in der direkten PspF-Regulation nicht von zentraler Relevanz ist.

Mit der Untersuchung der *Tip*-Region wurde dennoch erreicht, dass alle konservierten Aminosäurebereiche von PspA₁₋₁₄₄ zumindest grundlegend auf ihre PspF-regulatorischen Eigenschaften hin untersucht wurden, sodass davon auszugehen ist, dass die hier identifizierten FBR1 und FBR2 zentrale Bereiche zur PspF-Regulation darstellen (Abb. 21). Somit konnte ein stabiles monomeres Fragment von PspA identifiziert, seine Struktur aufgeklärt, sowie die für die PspF-Interaktion wichtigen Bereiche charakterisiert werden.

3.2 Der PspA·F-Komplex: PspA₁₋₁₄₄ stabilisiert

PspF-Hexamere und moduliert ihre ATPase-Aktivität

Die Interaktion von PspA und PspF, die in auf *In-silico*-Analysen basierenden Studien *in vivo* bereits eingehend charakterisiert werden konnte, wurde im Folgenden *in vitro* fortgeführt. Hierbei stand die Untersuchung der Bildung und der biochemischen Eigenschaften des regulativen Komplexes aus PspA und PspF im Mittelpunkt, bei der die Einflüsse der *in vivo* identifizierten PspF-bindenden Regionen auf den PspA·F-Komplex näher beleuchtet wurden. Dabei konnten bisher unbeschriebene Eigenschaften des Komplexes beobachtet werden, die das Verständnis der Rolle von PspA im PspA·F-Komplex grundlegend veränderten.

3.2.1 Reinigung der Proteine für *In-vitro*-Studien

Alle im Laufe der Untersuchungen benötigte Proteine wurden über Ni-IMAC und Anionentauscherchromatographie gereinigt und der Reinigungserfolg mittels SDS-PAGE und SEC überprüft. Hierbei konnten die löslichen und stabilen PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ (eine Variante von PspF mit deletierter DNA-Bindedomäne zur Steigerung der Löslichkeit) bereits auf der Ni-IMAC-Säule stark angereichert werden (Abb. 22), und durch einen linear ansteigenden Salzgradienten problemlos vom Ionentauscher eluiert und bis zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 23).

Das für die Kristallisation eingesetzte Seleno-Methionin-markierte PspA (SeMet-PspA₁₋₁₄₄) konnte indes aufgrund geringer Produktion des rekombinanten Proteins über die Ni-IMAC nur teilweise von ebenfalls Ni-NTA bindenden Kontaminanten getrennt werden (Abb. 24a, links). Auch hier konnte das Protein jedoch durch den Ionentauscher (Abb. 24b) bis zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 24a, rechts).

3.2.1 Reinigung der Proteine für *In-vitro*-Studien

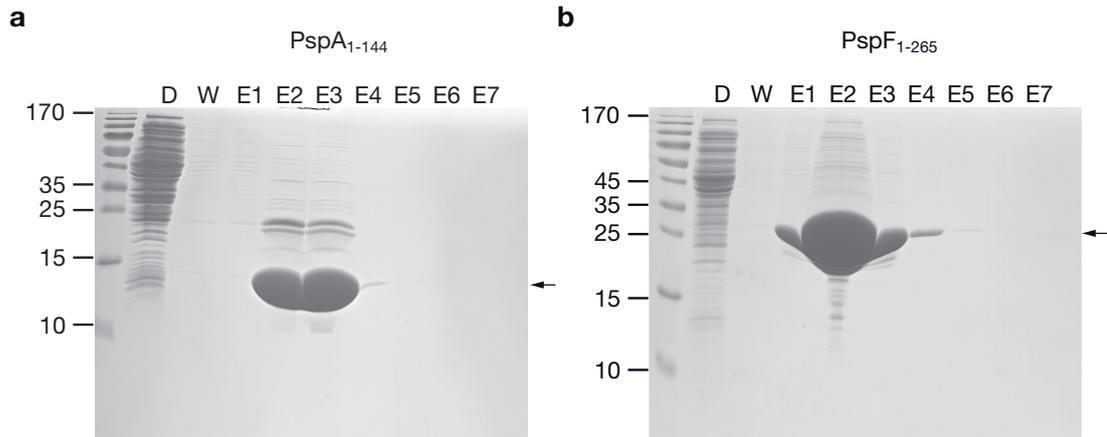


Abbildung 22 PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ lassen sich über Ni-IMAC stark anreichern. Ni-IMAC-Reinigung der stabilen und löslichen Proteinfragmente über einen fusionierten His-tag. (a) PspA₁₋₁₄₄, (b) PspF₁₋₂₆₅. Reinigung aus dem Überstand nach Ultrazentrifugation. Die Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gele (15%) zeigen Proben des Durchlaufs (D), des letzten Waschschruttes (W) und der Elutionsfraktionen (E1-7). Markerbanden links, Größe der Markerproteine in kDa. Laufhöhe von PspA₁₋₁₄₄ bzw. PspF₁₋₂₆₅ mit Pfeil markiert.

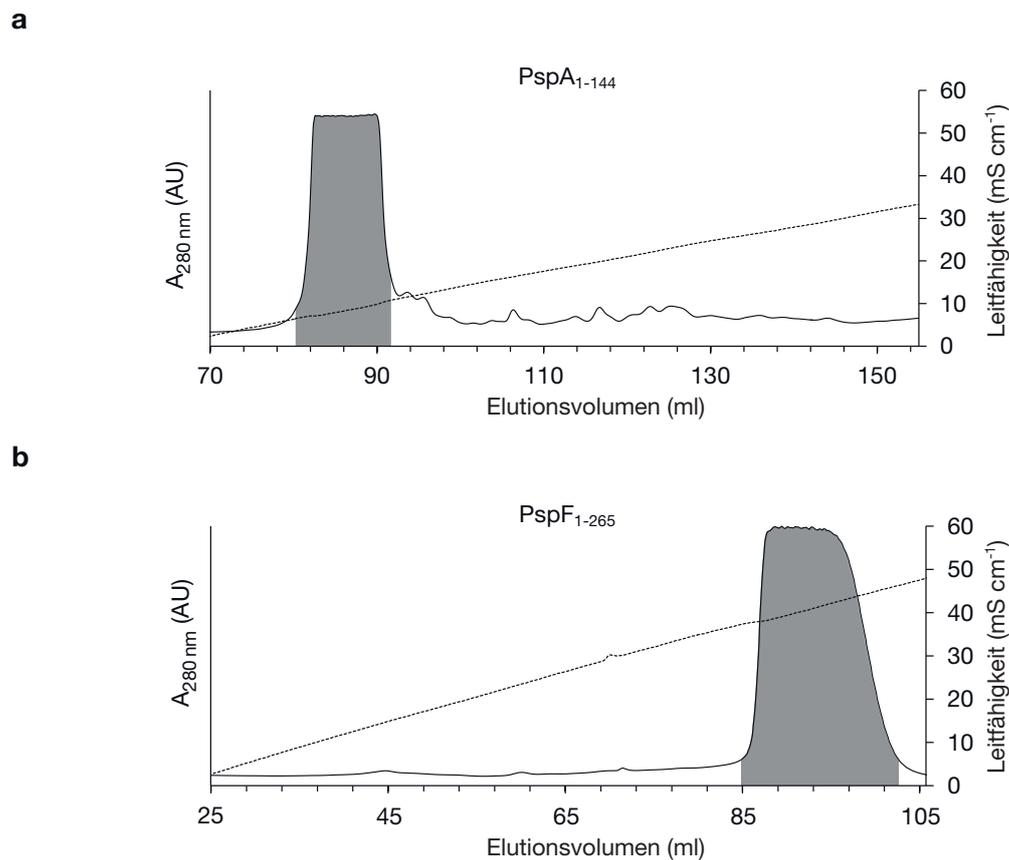


Abbildung 23 Reinigung von PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ über einen Anionentauscher. Elutionsprofil der bereits über Ni-IMAC angereicherten Proteine, (a) PspA₁₋₁₄₄, (b) PspF₁₋₂₆₅. Nach dem Beladen des Ionentauschers (bei ~5 mM NaCl) wurden die Proteine mit einem Salzgradienten (0–1 M NaCl, gestrichelte Linie und rechte Ordinate) von der Säule eluiert. Elutionspeaks der zu reinigenden Proteine grau hinterlegt.

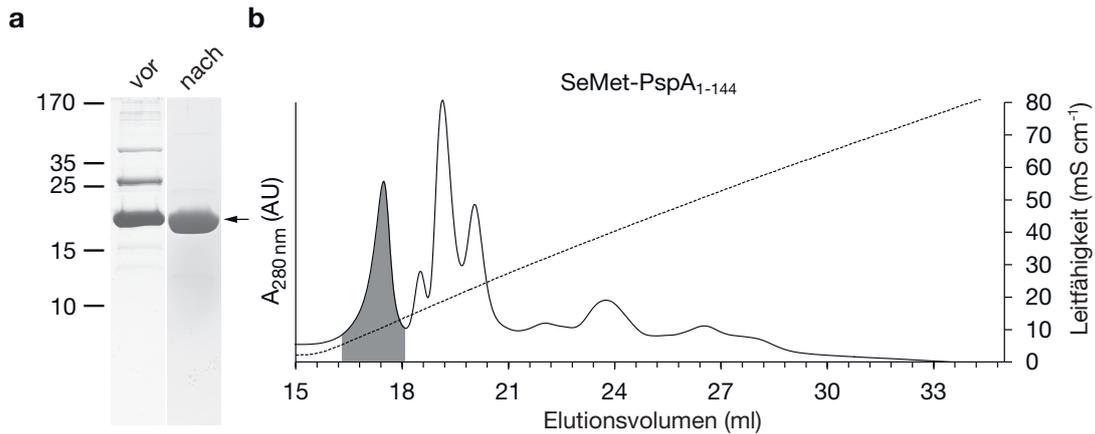


Abbildung 24 Reinigung von schwach produziertem SeMet-PspA₁₋₁₄₄. (a) SeMet-PspA₁₋₁₄₄ konnte über Ni-IMAC nur teilweise angereichert werden (*vor*, vereinte Elutionsfraktionen), jedoch gelang auch hier die vollständige Reinigung des Proteins durch einen Ionentauscher (*nach*, Elutionsfraktion des Ionentauschers). Schägger-PA-Gel (16%), Coomassie-Färbung. Größe der Markerproteine in kDa, Laufhöhe des SeMet-PspA₁₋₁₄₄ mit Pfeil markiert. (b) Elutionsprofil der in (a, *vor*) gezeigten Ni-IMAC-angereicherten Probe, Elutionspeak von SeMet-PspA₁₋₁₄₄ grau hinterlegt. Probe des Peaks zeigt in (a, *nach*).

3.2.2 PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ bilden einen SEC-stabilen Komplex

Die Interaktion und Komplexbildung von PspA, PspF und ihrer Fragmente ist bereits mittels *Gelshift*-Experimenten (Elderkin *et al.*, 2002; Elderkin *et al.*, 2005) sowie Größenausschluss-Chromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) untersucht worden (Joly *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013). Hierbei wurde von Joly *et al.*, 2009 die Komplexstochiometrie auf Basis von Gelfiltrationsdaten mit etwa 6 PspA zu 6 PspF angegeben. Im aktuell diskutierten Modell entsteht der 6:6-PspA-F-Komplex durch die Interaktion eines selbst-oligomerisierten Hexamers von PspA mit einem PspF-Ring (Mehta *et al.*, 2013; Jovanovic *et al.*, 2014, siehe Abb. 3 S.17). Nach jenem auf *In-vivo*-Messungen mit PspA-GFP-Fusionen (Lenn *et al.*, 2011) und Gelfiltrationen (Joly *et al.*, 2009) basierenden Modell ist der hexamere PspF-Ring demnach nur partiell und asymmetrisch mit (oligomerem) PspA besetzt, welches seinerseits eine Vorstufe größerer Oligomere darstellt. Für erste Studien zur Interaktion von PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls SEC-Experimente durchgeführt.

3.2.2 PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ bilden einen SEC-stabilen Komplex

PspA₁₋₁₄₄ eluierte auf einer Superose-6-Säule bei etwa 18,1 ml, was einem Molekulargewicht von etwa 38 kDa und damit einem PspA₁₋₁₄₄-Dimer entspricht (~ 36 kDa, Abb. 25, oben). Da für PspA₁₋₁₄₄ bereits mittels AUC etabliert wurde, dass es in Lösung ausschließlich in monomerer Form vorliegt, ist dieses Laufverhalten deutlich aberrant. Wie aus der Struktur des Proteins ersichtlich wird (Abb. 10, S.55), ist es etwa 10-mal so lang wie breit. Dies resultiert in einem erhöhten hydrodynamischen Radius relativ zu einem globulären Protein von 17,6 kDa, und macht eine Bestimmung des ungefähren Molekulargewichts von PspA₁₋₁₄₄ (oder von Komplexen, an denen es beteiligt ist) mittels SEC somit nicht möglich. PspF₁₋₂₆₅ eluierte bei 16,3 ml und somit etwa 131 kDa ($\sim 4,4$ -fache Größe des PspF₁₋₂₆₅-Monomers) mit deutlichem *Tailing* durch den sukzessiven Zerfall des hexameren Rings während der Chromatographie (Abb. 25, unten).

Trotz der eingeschränkten Aussagekraft der Gelfiltrations-Daten hinsichtlich des Molekulargewichts konnte die Bildung des PspA·F-Komplexes¹⁰ eindeutig nachgewiesen werden: Bei Titration von PspA₁₋₁₄₄ zu PspF₁₋₂₆₅ zeigte sich bei etwa 14,8 ml ein zweiter Peak im Chromatogramm bei gleichzeitiger Abnahme des PspF₁₋₂₆₅-Peaks, was auf die Bildung eines PspA·F-Komplexes hindeutet. Dieser Peak wurde mit steigender Konzentration von PspA₁₋₁₄₄ stärker und sein Maximum verlagerte sich im Zuge der Sättigung des Komplexes mit PspA₁₋₁₄₄ auf etwa 14,6 ml. Die Analyse von Elutionsfraktionen konnte die Co-Elution von PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ in einem PspA·F-Komplex-Peak bestätigen (Abb. 26, hier ist die Elution des PspA·F-Komplexes von einer präparativen Superdex-200-Säule gezeigt). Ab einem molaren Verhältnis von etwa 0,7 zu 1 (PspA:PspF) konnte in den Chromatogrammen der Titrations auch freies PspA₁₋₁₄₄ nachgewiesen werden. Interessanterweise war die Bildung des PspA·F-Komplexes als distinkte Spezies schon bei einem deutlichen Unterschuss von 0,17 zu 1 (PspA:PspF) erkennbar, woraus auf eine hohe Stabilität des Komplexes über die Dauer des Gelfiltrationslaufs (~ 30 min) geschlossen werden konnte.

¹⁰Der Einfachheit halber wird im weiteren Verlauf der PspA₁₋₁₄₄·PspF₁₋₂₆₅-Komplex wie auch der Komplex der WT-Proteine als PspA·F-Komplex bezeichnet.

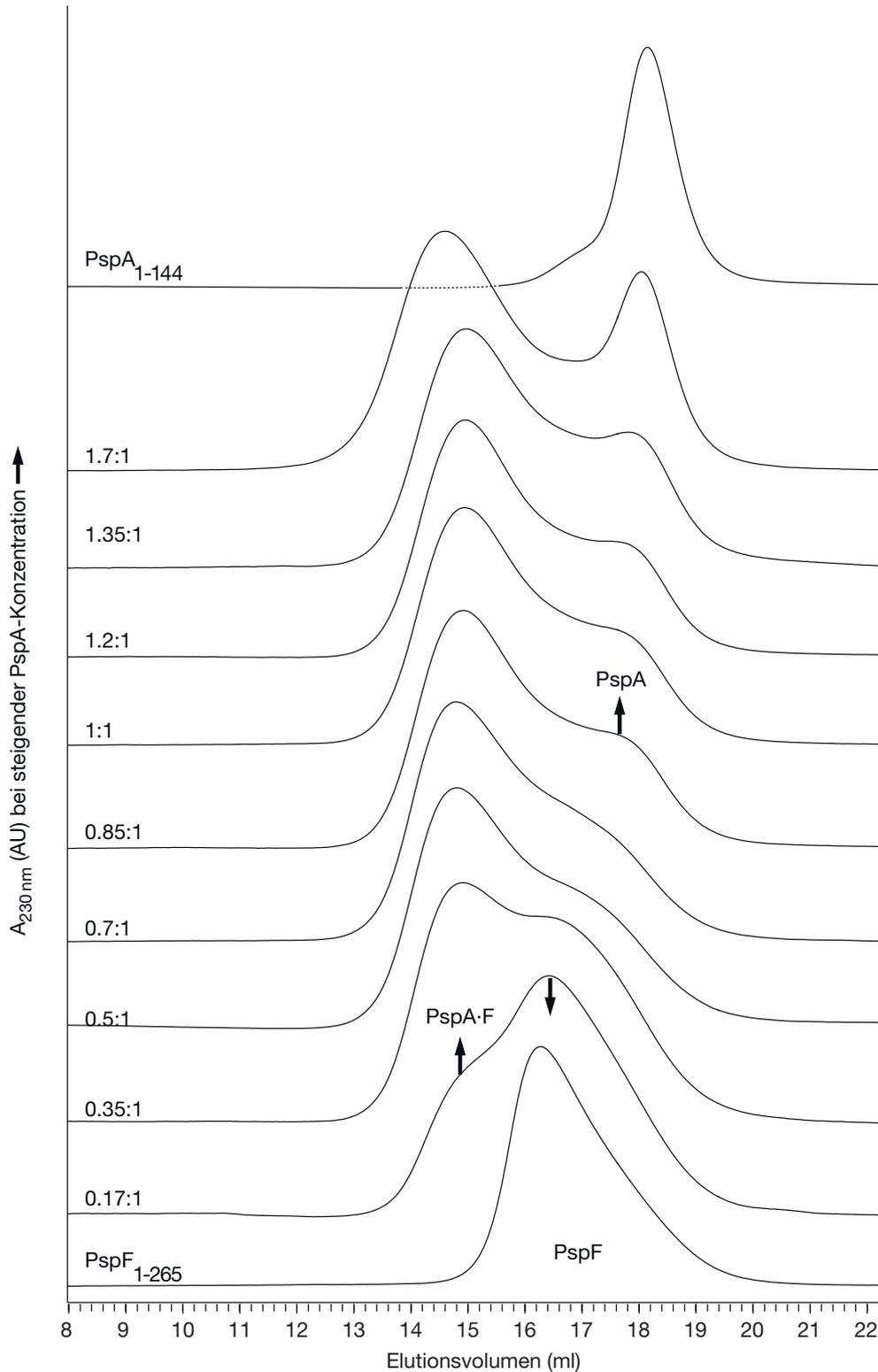


Abbildung 25 Die Titration von PspA₁₋₁₄₄ zu PspF₁₋₂₆₅ zeigt die Bildung eines PspA·F-Komplexes in der Gelfiltration. PspF₁₋₂₆₅ (130 μ M) wurde mit ansteigenden Mengen von PspA₁₋₁₄₄ präinkubiert (relatives molares Verhältnis PspA:PspF jeweils links angegeben) und die Komplexbildung mittels Gelfiltration verfolgt. Der PspA·F-Komplex konnte bereits bei 0,17:1 (PspA:PspF) nachgewiesen werden. Mit ansteigender PspA-Konzentration stieg auch die PspA·F-Peakintensität, während die des freien PspFs sank. Superose-6-10/300 GL Gelfiltrationssäule, Chromatogramme von PspA₁₋₁₄₄ (oben) und PspF₁₋₂₆₅ (unten) zum Vergleich aufgeführt.

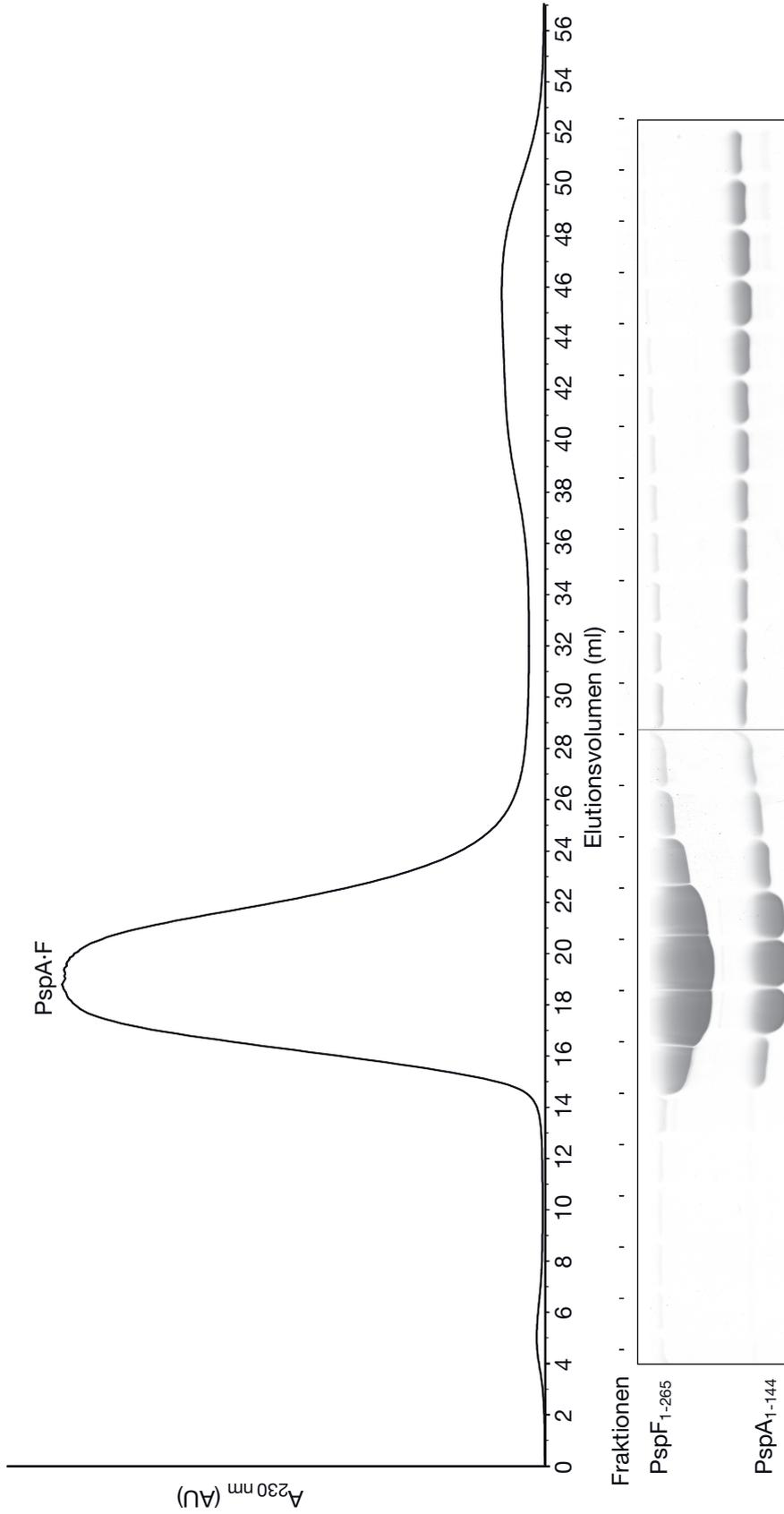


Abbildung 26 Schägger-PAGE-Analyse der PspA·F-Komplex-Elution. Chromatogramm der preparativen Elution einer Probe von 23 mg PspF₁₋₂₆₅ und 28 mg PspA₁₋₁₄₄ (oben), dazu unterhalb die in der Schägger-PAGE aufgetrennten Proben der Elutionsfraktionen. Co-Elution beider Proteine in einem homogenen Peak (14 und 24 ml), dazu spätere Elution des freien, im berschuss zugegebenen PspA₁₋₁₄₄. Säule: Superdex 200 16/60GL prep grade; Schägger-Gel (16%), Coomassie-gefärbt.

3.2.3 Analytische Ultrazentrifugation zeigt die stabilisierende Funktion von PspA im PspA·F-Komplex

Mittels Gelfiltration konnte die Komplexbildung durch PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ zwar nachgewiesen werden, jedoch machten das aberrante Laufverhalten von PspA₁₋₁₄₄ sowie die Verdünnung der Proben während der Gelfiltration (und damit einhergehend eine mögliche Komplex-Dissoziation) detailliertere Betrachtungen zur Klärung der Komplexstoichiometrie und -stabilität unmöglich. Daher wurden zur Bearbeitung dieser Fragestellungen Messungen mittels Analytischer Ultrazentrifugation (AUC) durchgeführt. PspA₁₋₁₄₄ wurde in ansteigender Konzentration zu 10 µM PspF₁₋₂₆₅ titriert und die Sedimentationsgeschwindigkeit der entstehenden Spezies in Abhängigkeit der PspA-Konzentration bestimmt (Abb. 27). Weiterhin wurden Titrationsmessungen mit den beiden Varianten PspA₁₋₁₄₄^{E37A} und PspA₁₋₁₄₄^{R59E} durchgeführt, um den Einfluss der beiden *in vivo* identifizierten PspF-Bindedomänen FBR1 und FBR2 auf die PspA·F-Komplexbildung näher zu untersuchen. Die FBR1-Variante PspA₁₋₁₄₄^{E37A} wurde ausgewählt, da der Austausch E37A *in vivo* den stärksten *Loss-of-inhibitory-function*-Effekt einer auf der PspA-Oberfläche lokalisierten Aminosäure zeigte (vgl. Abb. 15, S.64). PspA₁₋₁₄₄^{R59E}, eine FBR2-Variante, wurde aufgrund ihres *Gain-of-inhibitory-function*-Effektes gegenüber WT-PspA₁₋₁₄₄ ausgewählt.

PspA₁₋₁₄₄ zeigte starke Bindung zu PspF₁₋₂₆₅, einhergehend mit der Bildung eines PspA·F-Komplexes mit einem apparenten Sedimentationskoeffizienten von 11 S¹¹ (Abb. 27, schwarz). Der K_D wurde mit etwa 1 µM bestimmt. Aus der Gleichgewichtstitrationskurve konnte weiterhin eine 1:1-Komplexstoichiometrie für den PspA·F-Komplex bestimmt werden (Schnittpunkt der Start- und End-Tangenten der Bindekurve, gestrichelte Linien), in Übereinstimmung mit der aus SEC-Messungen bestimmten Stoichiometrie (Joly *et al.*, 2009). Da PspF bei den eingesetzten Konzentrationen zu einem deutlichen Teil in hexamerer Form vorlag (Abb. 28, das

¹¹Auch im Falle der AUC sind genaue Bestimmungen nur im Sedimentationsgleichgewicht möglich. Die hier meist durchgeführten Sedimentationsgeschwindigkeitsmessungen lassen daher nur die Angabe eines apparenten Sedimentationskoeffizienten zu.

3.2.3 Die AUC zeigt die stabilisierende Funktion von PspA im PspA·F-Komplex

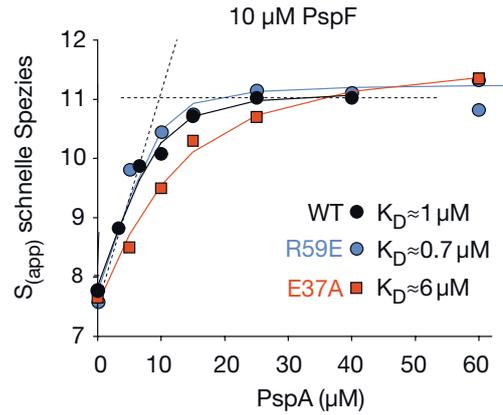


Abbildung 27 Bestimmung der Komplex-Stoichiometrie und des K_D -Wertes für die PspA-PspF-Interaktion bei $10\ \mu\text{M}$ PspF. Analytische Ultrazentrifugation, Titration von PspA₁₋₁₄₄ oder seiner Varianten PspA₁₋₁₄₄^{E37A} und PspA₁₋₁₄₄^{R59E} zu größtenteils hexamerem PspF ($10\ \mu\text{M}$). Angegeben ist der apparente Sedimentationskoeffizient der am schnellsten sedimentierenden Spezies. Der Schnittpunkt der gestrichelten Anfangs- und End-Tangenten der PspA₁₋₁₄₄-Titration (bei $\sim 10\ \mu\text{M}$ PspA) ergibt eine Komplex-Stoichiometrie von 1:1 und damit einen 6:6-Komplex.

Hexamer sedimentierte mit etwa $7,8\ S_{\text{app}}$), bilden PspA und PspF folglich einen 6:6-Komplex aus. PspA₁₋₁₄₄ ist ein ausschließlich monomeres Protein (Abb. 10, S.55), sodass PspA folglich an sechs distinkte Bindestellen auf einem hexameren PspF-Ring bindet. Dies widerspricht der Vorstellung, dass PspA im 6:6-PspA·F-Komplex asymmetrisch und oligomerisiert an PspF bindet.

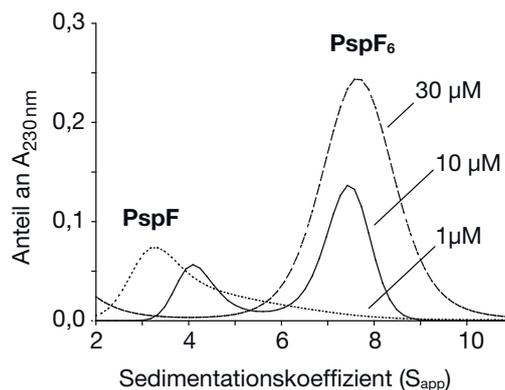


Abbildung 28 PspF₁₋₂₆₅ liegt bei einer Konzentration von $1\ \mu\text{M}$ nicht in hexamerer Form vor. Sedimentationskoeffizientenverteilung der PspF-Spezies bei verschiedenen Konzentrationen, Analytische Ultrazentrifugation (4 h, 40.000 rpm). PspF₁₋₂₆₅ bildete bei hohen Konzentrationen ($>10\ \mu\text{M}$) eine homogene, oligomere Spezies (PspF₆- PspF-Hexamer, $\sim 7,5\ S_{\text{app}}$). Bei einer Konzentration von $1\ \mu\text{M}$ bildete PspF₁₋₂₆₅ diese Spezies nicht mehr.

Die im Vergleich zu WT-PspA₁₋₁₄₄ untersuchten FBR-Varianten zeigten einen K_D für die Bindung an PspF₁₋₂₆₅ in gleicher Größenordnung wie WT-PspA₁₋₁₄₄, was zu erwarten war, da in beiden Fällen lediglich einzelne Reste in aus mehreren Aminosäuren bestehenden PspF-Interaktionsbereichen ausgetauscht worden waren, und in beiden Fällen PspF *in vivo* gebunden und inhibiert werden konnte. Die FBR1-Variante PspA₁₋₁₄₄^{E37A} zeigte hierbei jedoch eine deutlich schwächere Bindung (rot, K_D von 6 μ M), während die FBR2-Variante PspA₁₋₁₄₄^{R59E} vergleichbar zu PspA₁₋₁₄₄ mit PspF interagiert (blau, $K_D \approx 0,7 \mu$ M). Beide Varianten bildeten mit PspF₁₋₂₆₅ wieder die bei Sättigung mit 11 S_{app} sedimentierende Komplex-Spezies.

Ein PspA₁₋₁₄₄-Monomer ist ausreichend, um ein PspF-Hexamer zu stabilisieren.

Bisher wurde die Komplexbildung von PspA und PspF bei hoher Konzentration der beiden Proteine untersucht (wodurch PspF *per se* in hexamerer Form vorliegt), und somit insbesondere die Interaktion von PspA-Monomeren mit PspF-Ringen beleuchtet. Jedoch existiert PspF *in vivo* mit nur etwa 130 Kopien pro Zelle und damit in einer Konzentration unterhalb 1 μ M (Jovanovic *et al.*, 1997, PspA mit ~ 1500 Kopien, Valgepea *et al.*, 2013). Bei diesen Konzentrationen verschiebt sich das Oligomerisierungsgleichgewicht von PspF, sodass das Protein ausschließlich in nicht-hexamerem Zustand vorliegt (Abb. 28). Daher stellte sich die Frage, wie PspA mit PspF bei physiologischen Konzentrationen interagiert, d.h. ob PspA nur hexameres (also aktives) PspF bindet und damit inhibiert, oder ob es in der Lage ist, bereits mit nicht-hexamerem PspF präventiv zu interagieren und möglicherweise die Hexamerisierung zu unterbinden (eine typische Funktion der regulatorischen Domänen anderer bEBPs, De Carlo *et al.*, 2006). Für Messungen bei *in-vivo*-ähnlichen Bedingungen wurde daher 1 μ M PspF₁₋₂₆₅ eingesetzt, der S_{app} der größten PspF-Spezies sank in Folge geringerer bzw. ausbleibender Oligomerisierung dadurch von etwa 8 auf 4. Wiederum wurde mit PspA und seinen Varianten titriert.

Überraschenderweise zeigte sich, dass PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ auch bei 10-fach geringerer Konzentration beider Proteine weiterhin einen stabilen Komplex bildeten (Abb. 29a). Insbesondere fiel die sprunghafte Entstehung des Komplexes bereits bei

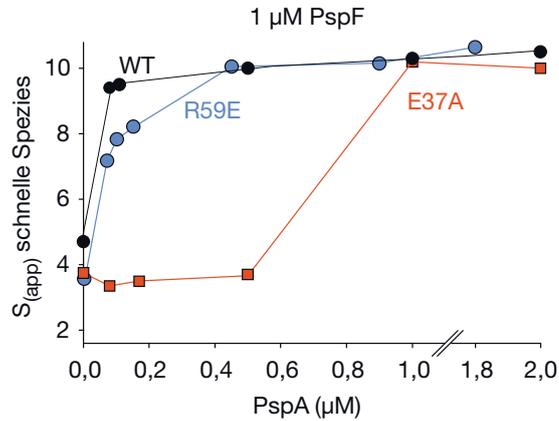
3.2.3 Die AUC zeigt die stabilisierende Funktion von PspA im PspA·F-Komplex

Zugabe von $0,08 \mu\text{M}$ PspA₁₋₁₄₄ auf (schwarz). Diese mit $\sim 10 S_{\text{app}}$ sedimentierende Spezies machte dabei etwa 46 % der gesamten UV-Absorption in der Messküvette aus (Abb. 29b). Da die UV-Absorption von PspA₁₋₁₄₄ bei diesen Konzentrationsverhältnissen zu vernachlässigen ist (der Molare Extinktionskoeffizient von PspA₁₋₁₄₄ ist zusätzlich 4-fach geringer als der von PspF₁₋₂₆₅), befinden sich demnach 46 % des PspF ($0,46 \mu\text{M}$) im PspA·F-Komplex. Setzt man diesen Wert nun zu den eingesetzten $0,08 \mu\text{M}$ PspA₁₋₁₄₄ ins Verhältnis ($0,08 : 0,46 \mu\text{M}$ oder $1 : 5,8$) wird deutlich, dass ein Monomer von PspA₁₋₁₄₄ bereits in der Lage ist, ein Hexamer von PspF₁₋₂₆₅ zu binden und über den Zeitraum der Ultrazentrifugationsmessung zu stabilisieren. Während die stabile Interaktion von PspA und PspF bei hohen Konzentrationen beider Proteine und dem Einsatz von PspA im Überschuss bereits beschrieben wurde (Joly *et al.*, 2009), ist dies die erste Beobachtung der substoichiometrischen Stabilisierung von PspF-Hexameren durch PspA, die zusätzlich dazu auch bei physiologischen Konzentrationen gemacht werden konnte.

Während die Menge des gebildeten PspA·F-Komplexes mit zunehmender Konzentration von WT-PspA₁₋₁₄₄ erwartbar stieg (Abb. 29b), zeigte sich für die Varianten PspA₁₋₁₄₄^{E37A} und PspA₁₋₁₄₄^{R59E} ein anderes Bild: PspA₁₋₁₄₄^{R59E} war wie WT-PspA₁₋₁₄₄ in der Lage, bei sub-stoichiometrischem Verhältnis einen stabilen PspA·F-Komplex zu bilden, jedoch erreichte die von ihm gebildete schnell sedimentierende Spezies erst bei einem Verhältnis von 0,5:1 einen ähnlichen S_{app} wie PspA₁₋₁₄₄ (Abb. 29a, blau), und auch dann vereinte der Komplex nur $\sim 40\%$ der UV-Absorption auf sich (Abb. 29b). Dieser Wert stieg im Verlaufe der Titration nicht weiter an, sodass die Komplexstabilität durch einen Austausch in der FBR2 gestört zu werden scheint. Die Effekte der FBR1-Variante waren ebenfalls deutlich auszumachen: So zeigte PspA₁₋₁₄₄^{E37A} keine Stabilisierung von PspF im sub-stoichiometrischen Bereich, jedoch nahezu WT-ähnliche Komplexstabilisierung ab einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$, mit leicht geringerer Effektivität (Abb. 29, rot).

Diese Veränderungen der PspA-PspF-Interaktion durch die Austausche E37A und R59E *in vitro* bestätigen, dass es sich bei den *in vivo* identifizierten und evolutionär

a



b

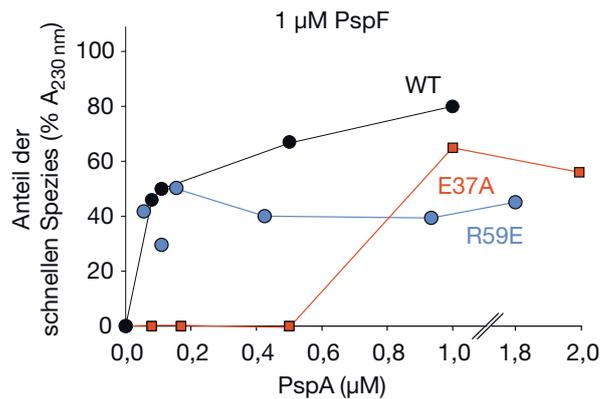


Abbildung 29 PspA₁₋₁₄₄ stabilisiert PspF-Hexamere bei 1 μM PspF₁₋₂₆₅. Analytische-Ultrazentrifugations-Titrations von WT-PspA₁₋₁₄₄, PspA₁₋₁₄₄^{E37A} und PspA₁₋₁₄₄^{R59E} (vgl. Abbildung 27), hier jedoch mit 1 μM. (a) Veränderung des Sedimentationskoeffizienten der am schnellsten sedimentieren Spezies mit steigender PspA-Konzentration. (b) Anteil der in (a) gezeigten Spezies an der Gesamtabsorption in der Messküvette. Mit 0,08 μM WT-PspA₁₋₁₄₄ in der Probe bildete 1 μM PspF₁₋₂₆₅ bereits zu ~46% hexamere Komplexe, sodass hierfür 1 PspA pro PspF-Ring ausreichend war. Varianten von PspA₁₋₁₄₄ führten entweder deutlich später (PspA₁₋₁₄₄^{E37A}) oder deutlich schwächer (PspA₁₋₁₄₄^{R59E}) zur PspA·F-Komplexbildung.

3.2.3 Die AUC zeigt die stabilisierende Funktion von PspA im PspA·F-Komplex

konservierten FBR1 und FBR2 tatsächlich um für die PspF-Interaktion kritische Bereiche auf PspA handelt.

N-terminale Modifikation von PspA₁₋₁₄₄ verhindert die PspF-Interaktion

Da bereits minimale Mengen von PspA in der AUC ausreichen um PspF in hexamerer Form zu stabilisieren, konnte über diese Methode keine Aussage darüber getroffen werden, ob PspA nur bereits hexamerisiertes PspF stabilisiert, oder es auch an nicht-hexamerisiertes PspF bindet und dadurch die Hexamerisierung von PspF induziert. Um die eingesetzten Mengen von PspA weiter verringern und durch Interaktion entstehende Spezies besser detektieren zu können, wurde PspA₁₋₁₄₄ *in vitro* mit einem N-terminalen Atto488-Fluorophor markiert (^{Atto}PspA₁₋₁₄₄). Trotz stabiler Reinigung (Abb. 30a) und Sedimentation vergleichbar dem unmarkierten PspA₁₋₁₄₄ konnte keine Interaktion von ^{Atto}PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ in AUC-Versuchen nachgewiesen werden. Das fluorophormarkierte PspA sedimentierte auch bei Zugabe von 1 μ M PspF vollständig auf Höhe des Monomers (Abb. 30b).

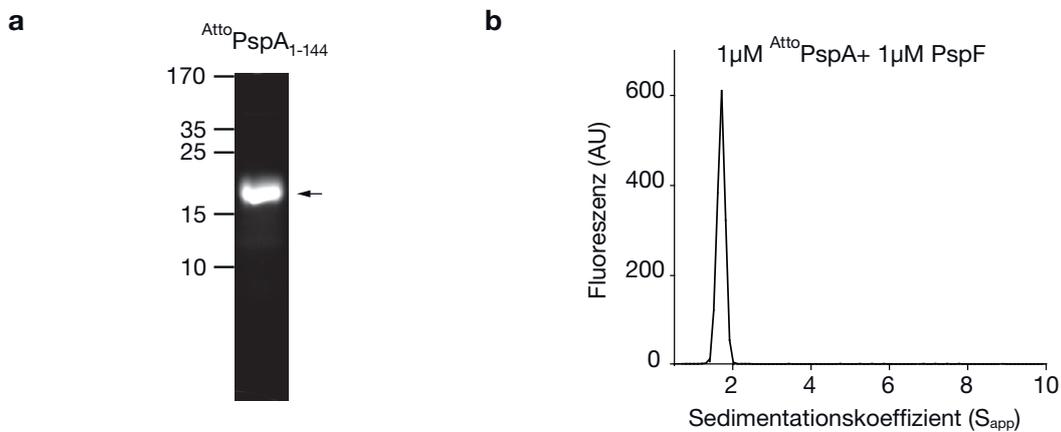


Abbildung 30 Die N-terminale Modifikation von PspA₁₋₁₄₄ *in vitro* verhindert die PspA-PspF-Interaktion (a) Nachweis des N-terminal mittels Atto488-HNS-Esters fluoreszenzmarkierten PspA₁₋₁₄₄ (Pfeil) durch Fluoreszenz im Schägger-Gel (16 %, Anregung bei 480 nm und Detektion mit GFP-Filter im BioImager). (b) ^{Atto}PspA₁₋₁₄₄ sedimentierte trotz Präinkubation mit PspF₁₋₂₆₅ in der AUC ausschließlich als Monomer. Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung, Detektion des Fluorophors durch *Cutoff*-Filter bei ≥ 505 nm.

Da das Fluorophor am Ende der rückfaltenden NTR und damit in unmittelbarer Nachbarschaft zu FBR1 lokalisiert ist, ist ein direktes Eingreifen von Atto488 in

die Interaktion denkbar. Möglich ist aber auch eine indirekte Störung der Interaktion durch strukturelle Modifikation der FBR1 (z.B. durch Destabilisierung oder Veränderung der Sekundärstruktur). Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund einiger Studien von Bedeutung, die Funktionen und Lokalisationen von N-terminal GFP-fusioniertem PspA untersuchen (Engl *et al.*, 2009; Mehta *et al.*, 2013; Jovanovic *et al.*, 2014), da selbst eine Markierung mit einem deutlich kleineren Molekül schon zu einem Verlust der PspF-Interaktion *in vitro*, und damit möglicherweise auch der PspF-Regulation *in vivo* kommt (siehe hierzu S.150 in der Diskussion).

Nukleotide haben keinen Einfluss auf die Bildung von PspF-Hexameren

Da durch AUC-Messungen ein ungewöhnlich starker PspF-stabilisierender Effekt von PspA gezeigt werden konnte, stellt sich die Frage, welche Relevanz der *in vitro* beobachtete Einfluss von PspA auf den Oligomerisierungszustand von PspF *in vivo* haben könnte, auch im Vergleich zu anderen PspF-stabilisierenden Faktoren. Für viele AAA+-Proteine sind Nukleotide zur Stabilisierung ihrer oligomeren Form von großer Bedeutung (Morito *et al.*, 2014; Akeov *et al.*, 2004). Im Falle von PspF ist zwar gezeigt worden, dass sowohl ADP als auch ATP PspF₁₋₂₇₅ stabilisieren, jedoch liegen hier nur Gelfiltrationsdaten für *per se* größtenteils hexamerer PspF vor ($\geq 9 \mu\text{M}$ PspF₁₋₂₇₅, Joly *et al.*, 2006), sodass nicht unterschieden werden kann, ob Nukleotide die Hexamerisierung von PspF unterstützen, oder vielmehr nur den Zerfall des Komplexes während der Gelfiltration verzögern. Weiterhin wurde mittels Isothermer Titrationskalorimetrie gezeigt, dass Nukleotide im Vergleich zu anderen AAA+-Proteinen nur schwach an PspF binden (Joly *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte AUC-Messungen bei nahezu physiologischen Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ PspF zeigten keinen messbaren Einfluss von ADP auf die Oligomerisierung des AAA+-Proteins (Abb. 31). Sowohl die Sedimentationskoeffizienten der von PspF gebildeten Spezies als auch ihre ungefähre Verteilung blieben bei ADP-Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,5 mM ADP nahezu konstant. Eine weitere Steigerung der Nukleotidkonzentration war aufgrund der geringen

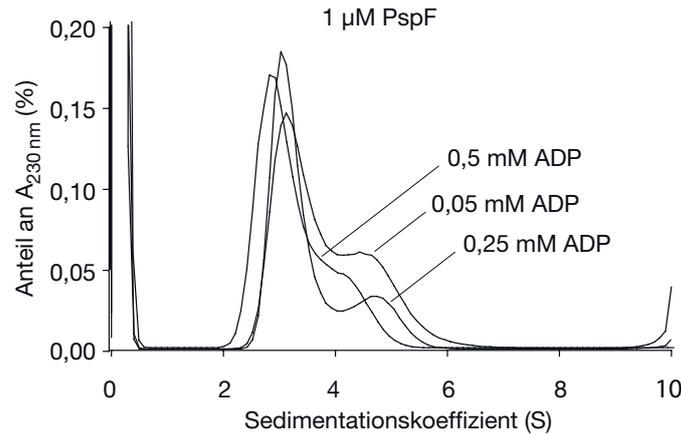


Abbildung 31 ADP hat keinen Effekt auf die Bildung und Stabilität von PspF-Hexameren. Die Zugabe von 0,05–0,5 mM ADP zu 1 µM PspF₁₋₂₆₅ zeigte keine Veränderung in den von PspF₁₋₂₆₅ gebildeten Spezies. Ein hexamerer PspF-Komplex würde mit $\sim 8 S_{(app)}$ sedimentieren. Analytische Ultrazentrifugation, Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung (vgl. 28).

Proteinmenge und der starken Absorption durch die Nukleotide nicht möglich.¹² Die hier eingesetzten 0,5 mM ADP entsprechen jedoch bereits dem 5-fachen K_D der ADP-Bindung (Joly *et al.*, 2006), sodass durch ADP hervorgerufene Änderungen im Oligomerisationsgleichgewicht erkennbar hätten sein müssen. Auf Basis der vorliegenden Daten kann daher angenommen werden, dass Nukleotiden keine zentrale Rolle in der Oligomerisierung von PspF unter physiologischen Bedingungen zukommt, insbesondere nicht im Vergleich zu PspA. Dies macht es wahrscheinlich, dass PspA auch *in vivo* zur Stabilität von hexamerem — und damit aktivem — PspF maßgeblich beiträgt.

3.2.4 PspA₁₋₁₄₄ ist ein Modulator der PspF-ATPase im gesättigten PspA·F-Komplex

Die Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Transkription der *psp*-Gene ist die zentrale Bedeutung des bEBPs PspF (Jovanovic *et al.*, 1997). PspA kommt dabei nach vorherrschender Interpretation die Rolle eines Inhibitors dieser Funktion zu, indem es die ATPase-Aktivität der AAA+-Domäne von PspF durch Bindung inaktiviert

¹² Messungen mit dem ATP-Analogen AMPPNP waren bisher aufgrund des Ausfallens von PspF₁₋₂₆₅ in der Probe ohne Erfolg und müssen in zukünftigen Versuchen wiederholt werden.

(siehe u.a. Elderkin *et al.*, 2002; Joly *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013). Daher sollte der Einfluss von PspA₁₋₁₄₄ und ihrer FBR1/FBR2-Varianten auf die ATPase-Aktivität von PspF näher untersucht werden. Aufgrund der bereits mittels AUC bestimmten K_D -Werte der PspA·F-Interaktionen konnten die ATPase-Aktivitäten dabei direkt in Beziehung zu den unter den jeweiligen Messbedingungen gebildeten Komplexenspezies gesetzt werden.

Der gesättigte PspA·F-Komplex besitzt eine basale ATPase-Aktivität

Bei einer Konzentration von 10 μM PspF₁₋₂₆₅ sowie 30 μM PspA₁₋₁₄₄ oder seiner Varianten konnte sowohl für WT-PspA₁₋₁₄₄ als auch PspA₁₋₁₄₄^{E37A} und PspA₁₋₁₄₄^{R59E} eine deutliche Inhibierung der ATP-Hydrolyse im Vergleich zur nicht-inhibierten PspF-Aktivität beobachtet werden (Abb. 32). Interessanterweise zeigte PspF in allen Fällen eine deutlich ausgeprägte basale ATPase-Aktivität von etwa 20 %. Diese ist umso bemerkenswerter, als PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ bei diesen Konzentrationen bereits einen vollständig saturierten PspA·F-Komplex ausbilden (vgl. Abb. 27, S.81). Diese basale ATPase-Aktivität wurde bereits sowohl für WT-PspA als auch PspA-Fragmente beobachtet, aber außer Acht gelassen (Elderkin *et al.*, 2002; Elderkin *et al.*, 2005; Joly *et al.*, 2009). Letztlich konnte in keiner Veröffentlichung die vollständige Inhibierung von PspF durch PspA gezeigt werden. Darüber hinaus konnte unerwarteterweise eine Veränderung der basalen ATPase-Aktivität durch PspA-Varianten gezeigt werden, die nicht mit den für beide Varianten bestimmten K_D -Werten korrelierte: Das schlechter bindende PspA₁₋₁₄₄^{E37A} ($K_D \approx 6 \mu\text{M}$) zeigte eine um 30 % erniedrigte, PspA₁₋₁₄₄^{R59E} ($K_D \approx 0,7 \mu\text{M}$) eine um etwa 30 % erhöhte basale ATPase-Aktivität von PspF.

Der PspA·F-Komplex dissoziiert langsam

Wie kommt es zu dem nicht unwesentlichen basalen ATPase-Level von PspF? Hier gäbe es zum einen die Möglichkeit, dass der gesättigte PspA·F-Komplex eine basale Aktivität zeigt, was PspA in seiner Funktion als Inhibitor der PspF-ATPase als ineffektiv erscheinen ließe, und zum anderen wäre möglich, dass einzelne

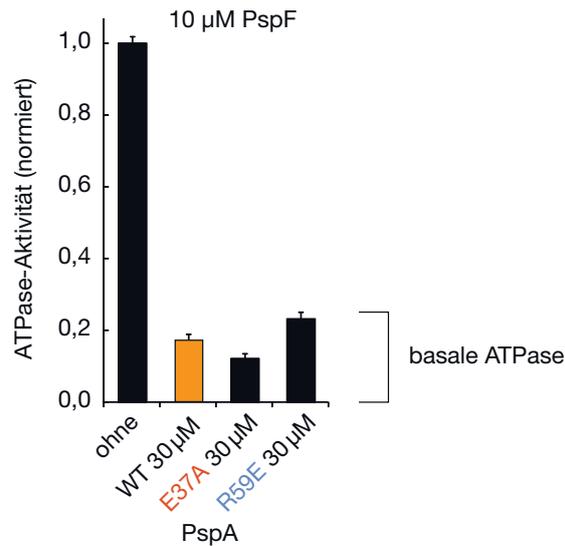


Abbildung 32 PspA₁₋₁₄₄ inhibiert die ATPase-Aktivität von PspF im gesättigten PspA·F-Komplex auf ein basales Level. Messung der ATPase-Aktivität von 10 μM PspF₁₋₂₆₅ (links) sowie ihre Veränderung nach Präinkubation mit 30 μM WT-PspA₁₋₁₄₄ oder seiner Varianten. Durch WT-PspA₁₋₁₄₄ wurde die ATPase-Aktivität von PspF auf ~20 % gesenkt, die Varianten senkten (PspA₁₋₁₄₄^{E37A}) oder erhöhten (PspA₁₋₁₄₄^{R59E}) das basale Level um 30 %. Nachweis der ATP-Hydrolyse anhand des freiwerdenden Phosphats mittels Malachitgrün-Assays, Daten normiert auf die unregulierte PspF₁₋₂₆₅-Aktivität im Messzeitraum.

PspF-Protomere im PspA·F-Komplex durch die Dissoziation von PspA transient ATPase-aktiv werden, bevor sie erneut von PspA gebunden werden. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurde die apparente Dissoziationskonstante k_{off} für die PspA-PspF-Interaktion bestimmt. Da die ATP-Hydrolyserate von PspF mit der Dissoziation von PspA erhöht wird, kann die zeitabhängige Änderung der ATP-Hydrolyserate von PspF nach starker Verdünnung von gesättigten PspA·F-Komplexen zur indirekten Messung des k_{off} dienen, eine Methode die häufig im Rahmen von Inhibitorstudien verwendet wird (Copeland *et al.*, 2011). Hierzu wurde gesättigter und hoch konzentrierter PspA·F-Komplex (30 μM PspA₁₋₁₄₄, 20 μM PspF₁₋₂₆₅) 1:40 in ATPase-Assaypuffer verdünnt und die Phosphatakkumulation durch ATP-Hydrolyse zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Abb. 33a). Als Referenz diente eine äquilibrierte Probe mit gleicher Endkonzentration von PspA und PspF (Abb. 33b). Für den PspA·F-Komplex ergab sich ein $k_{\text{off (app)}}$ von $2,69 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und dementsprechend eine Halbwertszeit von ≈ 43 Minuten. Dieses Ergebnis zeigt, dass der PspA·F-Komplex sehr stabil ist und bestätigt damit die

bisherigen Beobachtungen aus der Gelfiltration und Analytischen Ultrazentrifugation, in denen der PspA·F-Komplex über die Messung hinweg als stabile Spezies vorlag. Als Schlussfolgerung der k_{off} -Bestimmung ergibt sich, dass das gemessene basale ATPase-Level von PspF eine integrale Eigenschaft des vollständig mit PspA gesättigten, stabilen PspA·F-Komplexes ist.

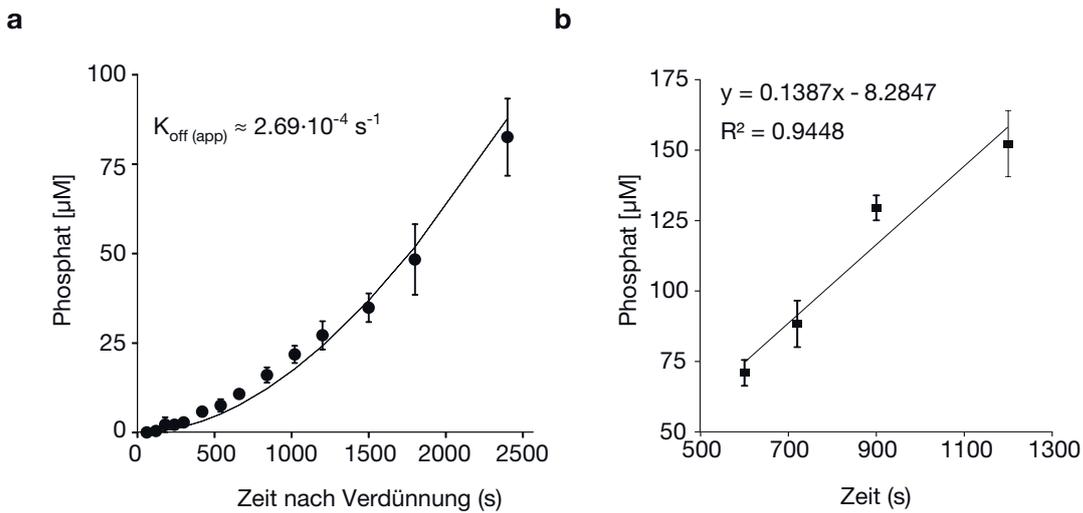


Abbildung 33 Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten k_{off} für PspA·F. (a) Konzentrierter PspA·F-Komplex wurde 1:40 in ATPase-Assaypuffer verdünnt und die Zunahme der PspF-Aktivität durch Dissoziation von PspA bestimmt (Malachitgrün-Assay). Als Referenz diente die in (b) gezeigte ATPase-Aktivität einer äquilibrierten Probe. Für weitere Details siehe Haupttext. Der $k_{\text{off (app)}}$ von $2,69 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ergab sich aus iterativem Näherungsverfahren (200.000 Iterationen) mittels R .

Die Regulation des basalen ATPase-Levels ist eine distinkte Funktion von PspA nach der PspF-Bindung

In weiteren ATPase-Messungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Regulation des basalen ATPase-Levels eindeutig eine distinkte Funktion von PspA nach Bindung an PspF ist. Dazu wurde die ATPase-Aktivität von PspF₁₋₂₆₅ (bei nahezu physiologischer Konzentration von 1 μM im teil-saturierten (PspA_{<6}·F₆-Komplex) im Vergleich zum vollständig gesättigten PspA·F-Komplex bestimmt (Abb. 34, vergleiche hierzu die Bestimmung der K_D -Werte für 10 μM PspF, Abb. 27 S.81).

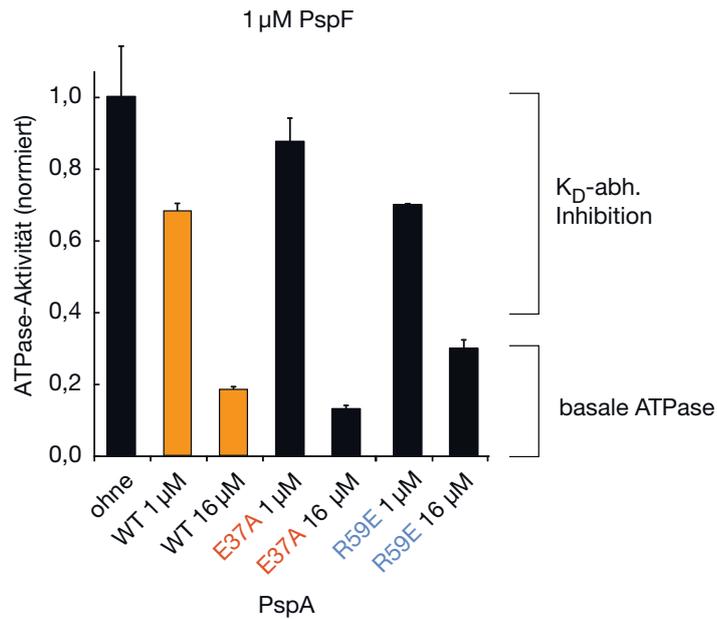


Abbildung 34 Der K_D beeinflusst die PspF-Inhibition nur im ungesättigten Komplex. ATPase-Aktivitätsmessungen mit $1 \mu\text{M}$ PspF₁₋₂₆₅ und nicht-sättigenden ($1 \mu\text{M}$) bzw. den Komplex sättigenden ($16 \mu\text{M}$) Konzentrationen von WT-PspA₁₋₁₄₄ und seinen Varianten. Unter nicht-sättigenden Bedingungen war die Effektivität der Inhibition durch PspA und seine Varianten den K_D -Unterschieden entsprechend, im gesättigten Komplex war die Inhibition der basalen ATPase hingegen unabhängig vom K_D . Nachweis der ATP-Hydrolyse anhand des freiwerdenden Phosphats mittels Malachitgrün-Assays, Daten normiert auf die unregulierte PspF₁₋₂₆₅-Aktivität im Messzeitraum.

Die Stärke der Inhibition von PspF war bei Einsatz von PspA und PspF in äquimolaren Konzentrationen (je $1 \mu\text{M}$) durch den K_D der PspA-PspF-Interaktion von PspA₁₋₁₄₄ bzw. seiner Varianten bestimmt: WT-PspA₁₋₁₄₄ ($K_D \approx 1 \mu\text{M}$) inhibierte PspF₁₋₂₆₅ auf $\sim 70\%$ der nicht-inhibierten Aktivität, die schwächer bindende FBR1-Variante PspA₁₋₁₄₄^{E37A} ($K_D \approx 6 \mu\text{M}$) inhibierte PspF hingegen deutlich schwächer auf 90% der Aktivität unregulierten PspFs. PspA₁₋₁₄₄^{R59E} ($K_D \approx 0,7 \mu\text{M}$), die Variante mit einem Austausch in FBR2, inhibierte PspF aufgrund des WT-ähnlichen K_D vergleichbar mit WT-PspA₁₋₁₄₄. Ein anderes Bild zeigte sich jedoch in vollständig saturierten PspA·F-Komplexen, d.h. bei hohem Überschuss von PspA ($16 \mu\text{M}$). Hier konnte für WT-PspA₁₋₁₄₄ eine basale PspF-Aktivität von $\sim 18\%$ gemessen werden, für das schlechter PspF-bindende PspA₁₋₁₄₄^{E37A} jedoch unerwarteter Weise eine um 30% geringere basale ATPase-Aktivität, und für das WT-PspA₁₋₁₄₄-ähnlich bindende PspA₁₋₁₄₄^{R59E} eine 40% höhere Aktivität. Diese Aktivitäten stimmen

mit denen höher konzentrierter Komplexe überein (Abb. 32) und zeigen deutlich, dass die bindungsabhängige Inhibition von PspF K_D -abhängig ist, PspA und seine Varianten jedoch nach vollzogener Bindung K_D -unabhängig auf die ATPase-Aktivität einwirken. Eine interessante wenn auch kontraintuitive Beobachtung war hier, dass die *in vivo* stärker *psp*-inhibierende Variante PspA₁₋₁₄₄^{R59E} eine höhere ATPase-Aktivität als WT-PspA₁₋₁₄₄ zeigte, die *in vivo* induzierend wirkende Variante PspA₁₋₁₄₄^{E37A} hingegen zu einer geringeren basalen ATPase-Aktivität von PspF im PspA·F-Komplex führte, entgegen der Annahme, dass die ATPase-Aktivität von PspF direkt mit seiner Fähigkeit zur Transkriptionsinduktion zusammenhängt. Jedoch kann mittels ATPase-Aktivitätsmessungen nur der Wert der durchschnittlichen ATPase-Aktivität für PspF bestimmt werden. Varianten von PspA könnten hingegen z.B. die regulierte Abfolge der ATP-Hydrolyse in PspF-Hexameren stören oder modulieren, was die Transkriptionsinitiation stark beeinflussen würde, in ATPase-Messungen jedoch nicht erkennbar wäre (für die weiterführende Diskussion siehe S. 4.1.1).

Als Randnotiz zur weiteren Bestätigung dieser Interpretation sei hier noch der Effekt mangelnder Äquilibrierung von PspF und PspA vor Beginn der ATPase-Assays angeführt (Abb. 35). Nach der k_{off} -Bestimmung, welche die hohe Stabilität des PspA·F-Komplexes nach Verdünnung deutlich machte, wurde das Versuchsprotokoll für ATPase-Messungen deutlich verändert. Die Prä-Äquilibrierung von PspF₁₋₂₆₅ erfolgte im nahezu finalen Volumen des ATPase-Assays (ohne PspA und ATP) für 1 Stunde. Konzentriertes PspA wurde erst danach in einem geringen Volumen zugegeben, gefolgt von einer weiteren Stunde Inkubation, sodass PspF vor PspA-Zugabe bereits in $\sim 98\%$ des Endvolumens des Ansatzes äquilibriert werden konnte, und PspA dadurch nicht in Kontakt mit hoch-konzentriertem hexameren PspF kam. Ohne diese Prä-Äquilibrierungen konnte in früheren Versuchen ein stärkerer Effekt von WT-PspA₁₋₁₄₄ auf die K_D -abhängige Inhibition von PspF₁₋₂₆₅ beobachtet werden (Abb. 35). PspA führte hier bei äquimolaren (End-)Konzentrationen von $1\ \mu\text{M}$ zu einer Inhibition von PspF auf 30% der nicht inhibierten Aktivität (statt 70% , gestrichelte Linie). Dies geschah wahrscheinlich aufgrund der Prä-Inkubation der beiden Proteine bei höheren Konzentrationen,

3.2.5 PspA^{E37A} ist ein Aktivator der PspF-Variante PspF^{W56A}

welche die (K_D - und konzentrationsabhängige) Bildung des PspA·F-Komplexes begünstigen. Dadurch konnte eine artifizuell hohe Menge an PspF auch nach der Verdünnung aufgrund des niedrigen k_{off} im PspA·F-Komplex „fixiert“ und inhibiert werden. Die basale ATPase-Aktivität des gesättigten Komplexes blieb davon wie erwartet unberührt.

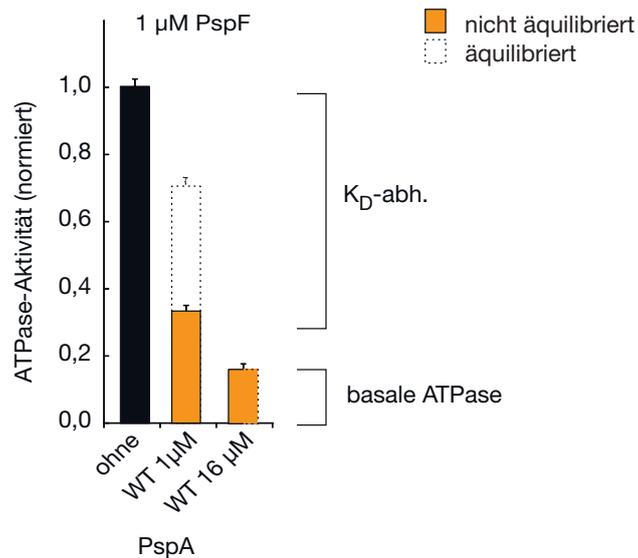


Abbildung 35 Mangelnde Prä-Äquilibration verstärkt die K_D -abhängige Inhibition von PspF₁₋₂₆₅ durch PspA₁₋₁₄₄, ändert das basale ATPase-Level aber nicht. Aufgrund der hohen Halbwertszeit für die PspA·F-Interaktion wurde (bei gleicher Endkonzentration im Ansatz) eine höhere Inhibition durch PspA₁₋₁₄₄ erreicht, wenn PspF₁₋₂₆₅ nicht ausreichend prä-äquilibriert wurde (orange), Aktivität der äquilibrierten Probe gestrichelt skizziert (aus Abb. 34). Das basale ATPase-Level blieb hiervon unberührt und sank nicht weiter. Nachweis der ATP-Hydrolyse anhand des freiwerdenden Phosphats mittels Malachitgrün-Assays, Daten normiert auf die unregulierte PspF₁₋₂₆₅-Aktivität im Messzeitraum.

3.2.5 PspA^{E37A} ist ein Aktivator der PspF-Variante PspF^{W56A}

Bereits vor längerer Zeit wurde die Aminosäure W56 auf der Oberfläche von PspF als Determinante zur Bindung von PspA identifiziert (Elderkin *et al.*, 2005). Daher wurde in einigen Experimenten die Wirkung des W56A-Austausches auf die PspA₁₋₁₄₄-PspF-Interaktion untersucht (Abb. 36).

Hierzu wurden *pspF* bzw. *pspF*^{W56A} in einem *psp*-Reporterstamm mit deletiertem chromosomalem *pspF* von einem *Low-copy*-Plasmid aus konstitutiv exprimiert (pUL). Dies führte zu einem etwa 10-fach erhöhten *psp*-Level, welches jedoch

durch gleichzeitige Produktion von PspA₁₋₁₄₄ wie erwartet reduziert werden konnte (Abb. 36a, links). PspF^{W56A}₁₋₂₆₅ produzierende Stämme zeigten generell ein erhöhtes *psp*-Level im Vergleich zu WT-PspF, was die schlechtere Regulation dieser PspF-Variante durch das endogene PspA widerspiegelt. Simultane Produktion des effektivsten PspF-inhibierenden PspA-Fragments PspA₁₋₁₄₄ konnte das *psp*-Level nur unwesentlich senken (Abb. 36a, grün). Gleichzeitig konnten Messungen in der AUC zeigen, dass PspA₁₋₁₄₄ nur sehr schwach mit PspF^{W56A}₁₋₂₆₅ interagiert (Abb. 36b, grün). Der K_D konnte aufgrund der schlechten Bindung nicht genau bestimmt werden, lag aber etwa beim 100-fachen K_D der Interaktion der WT-Fragmente. Gleiches wurde ebenfalls in Gelfiltrationsexperimenten deutlich, wo keine Komplexbildung durch PspF^{W56A}₁₋₂₆₅ und PspA₁₋₁₄₄ erkennbar war, unabhängig von den Konzentrationen beider Proteine (Abb. 36c, der schwarze Pfeil markiert das Elutionsmaximum des PspA·F-Komplexes, siehe Abb. 25 S.78).

PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ aktiviert PspF^{W56A} über einen von der PspA-Inhibitorfunktion entkoppelten Mechanismus

Dies machte es umso bemerkenswerter, dass die Variante PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ *in vivo* einen aktivierenden Effekt auf PspF^{W56A} zeigte (Abb. 36, blau). Trotz mit WT-PspA₁₋₁₄₄ vergleichbarer, schlechter Bindung an PspF^{W56A} wurde das *psp*-Level durch PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ auf das 1,5-fache erhöht. Dieser Effekt kann nicht durch eine schlechtere Bindung von PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ als PspA₁₋₁₄₄ an PspF zustande gekommen sein, denn im Falle schlechter Bindung hätte sich das *psp*-Level des PspA^{E37A}₁₋₁₄₄-produzierenden Δ *pspF*-Reporterstammes der Aktivität der Leervektorkontrolle annähern müssen. Der beobachtete Effekt ließe sich aber folgendermaßen erklären: PspA₁₋₁₄₄ und PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ binden gleich schlecht an PspF^{W56A}, aufgrund ihrer hohen Konzentration in Zellen bilden beide aber trotzdem einen gesättigten Komplex mit PspF^{W56A} aus (dies funktioniert bei ca. 30-fachem Überschuss des Fragments *in vivo*, siehe Abb. 36b). In diesem Komplex stört der W56A-Austausch auf PspF nun die inhibitorische Funktion der Fragmente, sodass keine Inhibition durch PspA₁₋₁₄₄ und PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ erfolgt. Gebundenes PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ besitzt aber eine induzierende Ei-

3.2.5 PspA^{E37A} ist ein Aktivator der PspF-Variante PspF^{W56A}

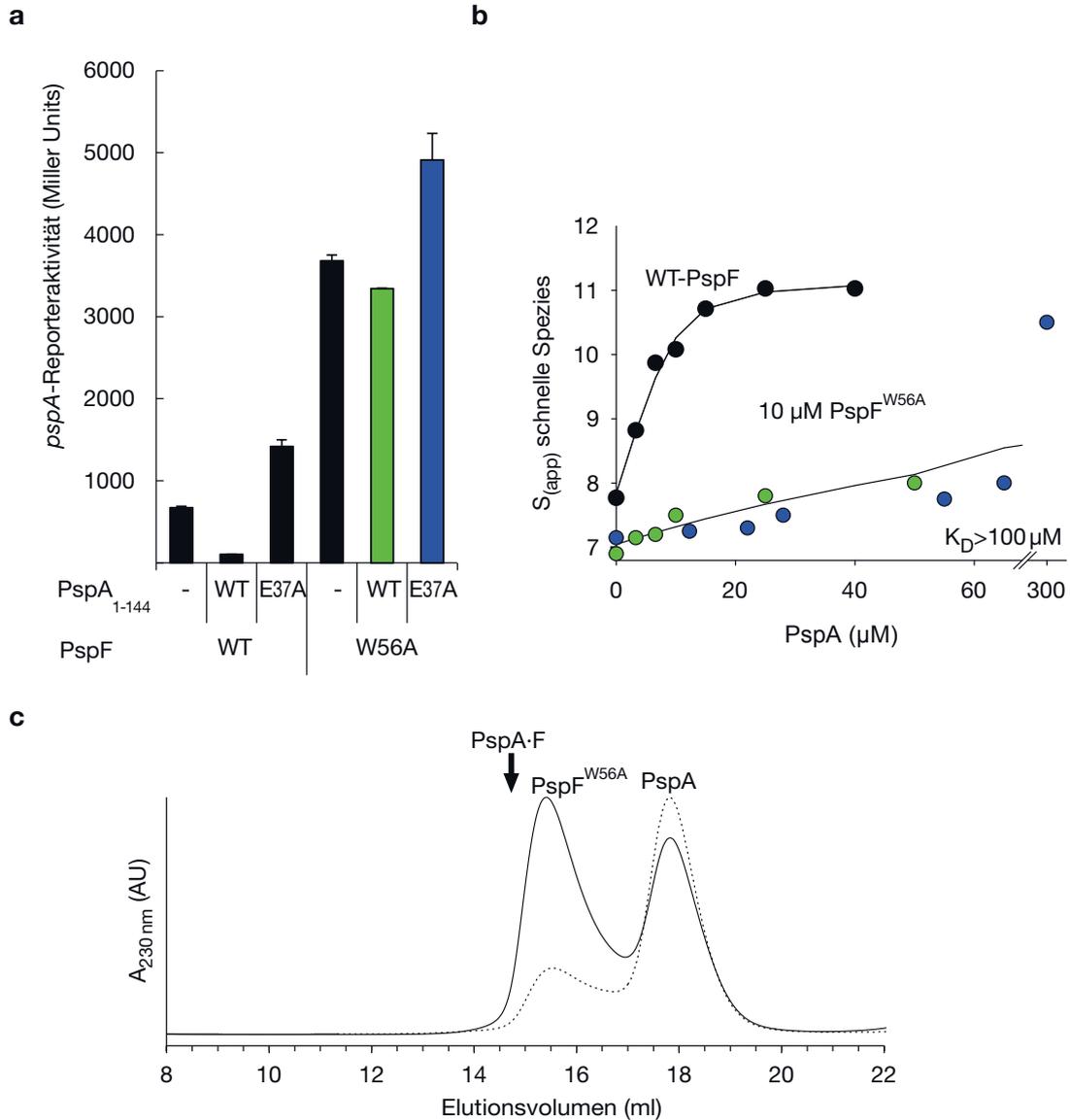


Abbildung 36 Die nur schwach PspA₁₋₁₄₄ bindende W56A-Variante von PspF wird von PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ *in vivo* aktiviert. (a) *in-vivo*-Reporterstudien im Δ *pspF*-Reporterstamm. LacZ-Aktivitätsmessungen des Effekts von WT-PspA₁₋₁₄₄ bzw. PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ (pBAD) auf das *in trans* produzierte PspF bzw. PspF^{W56A} (pUL) zeigten, dass PspA₁₋₁₄₄ die Aktivität von PspF^{W56A} *in vivo* erhöhte (grün). (b) Titrationsmessungen: PspA₁₋₁₄₄ und PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ interagieren nur noch schwach mit PspF^{W56A}₁₋₂₆₅ ($k_D > 100 \mu\text{M}$). Zum Vergleich ist die Titration mit WT-PspF gezeigt (vgl. Abb. 27). Analytische Ultrazentrifugation, Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung, dargestellt ist die am schnellsten sedimentierende Spezies. (c) Gelfiltration (Superoose 6 10/300 GL): Es konnte keine Bildung eines PspA·F-Komplexes mit PspF^{W56A}₁₋₂₆₅ beobachtet werden, weder bei Präinkubation von 70 μM PspF^{W56A}₁₋₂₆₅ + 110 μM PspA₁₋₁₄₄ (durchgezogene Linie), noch mit PspA-Überschuss (40 μM PspF + 200 μM PspA, gestrichelte Linie).

genschaft: PspA₁₋₁₄₄^{E37A} scheint im Δ pspA-Reportertamm weniger inhibierend als PspA₁₋₁₄₄ (vgl. 15, S. 64), „überstimmt“ aber auch im WT-Reporterstamm die PspF-Inhibition durch endogenes WT-PspA₁₋₂₂₂ und führt zur Induktion des Reporters (vgl. 16, S. 66). Scheinbar funktioniert dieser induzierende Effekt in der Interaktion mit PspF^{W56A} wie mit WT-PspF, und ist von dem inhibitorischen Effekt von PspA entkoppelt, der durch PspF^{W56A} aufgehoben wird. Dies kann als weiterer deutlicher Hinweis darauf interpretiert werden, dass gebundenes PspA als Modulator der PspF-Aktivität wirkt, hier müssen in Zukunft aber noch weitere Experimente, wie ATPase-Assays, zur genaueren Charakterisierung dieses Effektes durchgeführt werden.

Zusammenfassend deutet die hier gezeigte biochemische Charakterisierung der Stoichiometrie, Kinetik und ATPase-Aktivität des PspA·F-Komplexes darauf hin, dass PspA und PspF einen Komplex aus 6 PspA und 6 PspF ausbilden, welcher über einen langen Zeitraum hinweg stabil ist. PspA wirkt bei Bindung inhibierend auf die ATPase von PspF, bis zum Erreichen eines basalen ATPase-Levels im gesättigten PspA·F-Komplex. Varianten von PspA zeigen hierbei, dass die Bereiche FBR1 und FBR2 an der Bindung und Inhibierung von PspF sowie der Regulation der basalen ATPase beteiligt sind. Die Modulation dieses basalen ATPase-Levels stellt aufgrund ihrer K_D -Unabhängigkeit wahrscheinlich keine direkten Effekt der Bindung von PspA an PspF dar, sondern kann auf Basis der vorliegenden Daten als eigenständige Funktion von gebundenem PspA im PspA·F-Komplex gesehen werden. Diese sind bisher unbeschriebene Eigenschaften des PspA·F-Komplexes, die nahelegen, dass PspA *in vivo* eher die Funktion eines Modulators der PspF-Aktivität zukommt als die eines klassischen Inhibitors.

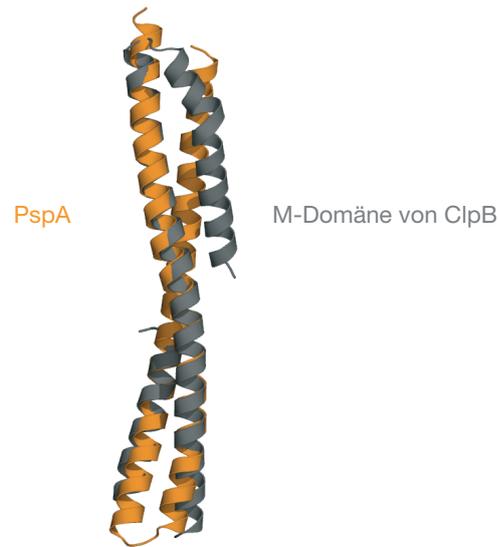
3.2.6 ClpB als Vorlage für den PspA·F-Komplex

Auf Grundlage der Monomerstrukturen von PspA und PspF wurde ein Modell des PspA·F-Komplexes entwickelt. Dabei diente die Disaggregase ClpB als Vorlage, da sie — wie PspF — eine hexamerisierende AAA+-Domäne besitzt, deren Aktivität durch einen *coiled coil* reguliert wird, die M-Domäne (ClpB-MD; S. Lee *et al.*, 2003; Mogk *et al.*, 2003; Schirmer *et al.*, 2004). PspA₁₋₁₄₄ und ClpB-MD zeichnet eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aus, die im Folgenden analysiert wird. Ihre funktionale Ähnlichkeit, die sich weit über strukturelle Aspekte hinaus erstreckt, wird in der Diskussion weiterverfolgt. Auf Basis von ClpB wurde mittels atomistischer Simulationen eine stabile PspA-PspF-Interaktion gefunden, bei der ein PspA-Monomer zwei Protomere des PspF-Rings bindet.

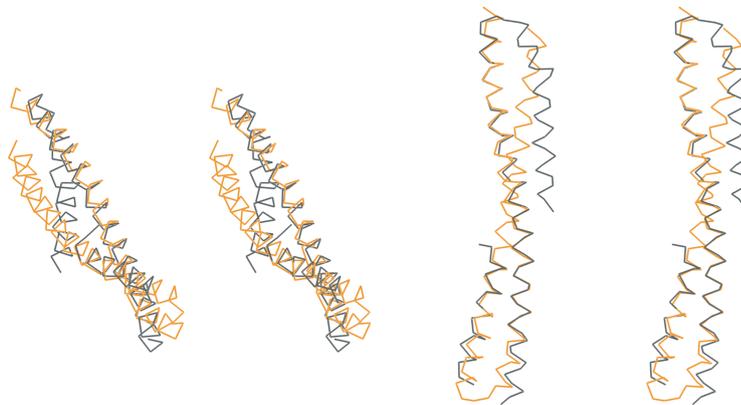
ClpB-MD und PspA₁₋₁₄₄ zeigen große strukturelle Ähnlichkeit

Das Proteinrückgrat von PspA₁₋₁₄₄ und ClpB-MD (ClpB₃₉₉₋₅₁₃) wurde mittels Swiss-PdbViewer überlagert. Das Ergebnis des besten *fits* ist in Abbildung 37a dargestellt (*b* zeigt die stereoskopische Ansicht des Rückgrats). Hier zeigte sich die hoch-ähnliche Struktur beider Proteine (RMSd für alle Rückgrat-Atome 1,1 Å), die jedoch durch zwei unterschiedliche Architekturen hervorgebracht wird: Als große Gemeinsamkeit besitzen beide Proteine eine durchgehende, *coiled-coil*-bildende Helix von quasi identischer Länge (CC2 in PspA bzw. H2 in ClpB; siehe Schema in Abb. 37c). Ihr Interaktionspartner besteht in PspA ebenfalls aus einer durchgehenden Helix (CC1), in ClpB jedoch wird diese Struktur aus zwei einzelnen helikalen Bereichen gebildet (H3/4 und H1), an deren Enden die ClpB-MD mit der AAA+-Domäne fusioniert ist. Trotz dieser unterschiedlichen helikalen Aufteilung ist die N-C-terminale Richtung der Primärsequenz in beiden Proteinen identisch (schwarze Pfeile in Abb. 37c). Die unterschiedliche Aufteilung der helikalen Domänen erschwerte das Alignment der Primärstruktur von PspA und ClpB und führte dazu, dass Strukturalgorithmen, die häufig auf Basis eines Primärsequenz-Alignments arbeiten, nicht in der Lage waren, PspA und ClpB-MD strukturell zu vergleichen (z.B. *align* in PyMol und SwissPdb). Dies mag auch der

a



b



c

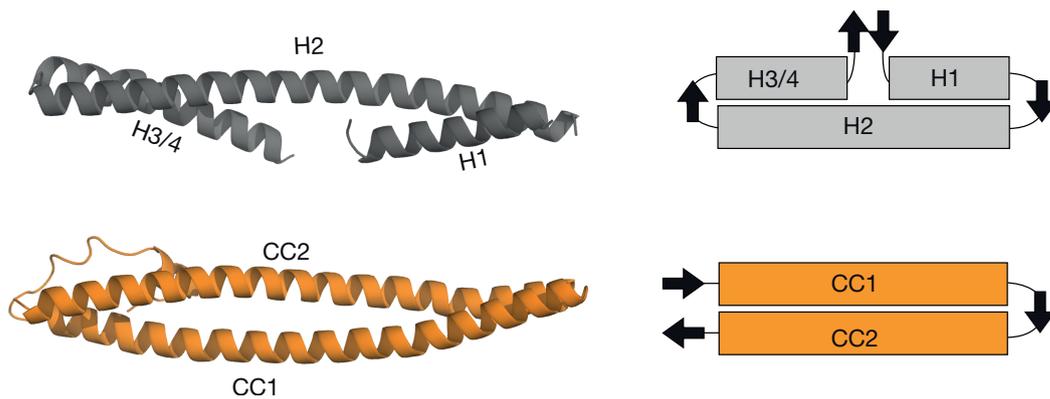


Abbildung 37 Vergleich von PspA₁₋₁₄₄ und ClpB-MD. PspA in orange, ClpB-MD in grau. (a) Überlagerung der helikalen Bereiche von PspA₁₋₁₄₄ und ClpB-MD mittels Sekundärstrukturalignments in Swiss-PdbViewer. (b) Zwei stereoskopische Ansichten des Proteinrückgrats der in (a) gezeigten Überlagerung (c) Gegenüberstellung der Aufteilung von PspA₁₋₁₄₄ und ClpB-MD. Links Benennung der Helices, rechts schematische Darstellung. In beiden Proteinen ist die N-zu-C-terminale Orientierung der Domänen trotz unterschiedlicher Aufteilung gleich (schwarze Pfeile). Für Details siehe Haupttext.

Grund dafür sein, dass die Ähnlichkeit von PspA und ClpB bisher *in silico* nicht aufgefallen ist.

Atomistische Simulationen zeigen einen möglichen PspA·F-Komplex

ClpB diene nun im Weiteren als Leitvorstellung für atomistische Simulationen¹³, mit Hilfe derer mögliche Interaktionsstellen von PspA auf PspF gefunden werden sollten. Hierzu wurde hexamerer PspF aus der bekannten Kristallstruktur (Rappas *et al.*, 2005) modelliert, und PspA_{1–144} nach dem Beispiel von ClpB–MD lateral an seiner Oberfläche positioniert. Die Orientierung der ClpB–MD am AAA+–Ring ist flexibel (Zietkiewicz *et al.*, 2010) und seine genaue Ausrichtung trotz bekannter (Monomer–)Kristallstrukturen noch Gegenstand aktueller Diskussionen (Zietkiewicz *et al.*, 2010; Oguchi *et al.*, 2012; Desantis *et al.*, 2014; Carroni *et al.*, 2014), sodass PspA dementsprechend in verschiedenen Winkeln (von flach „liegender“ bis hin zu senkrechter Ausrichtung) zu PspF hin orientiert wurde. In allen Fällen wurde PspA so positioniert, dass die Regionen FBR1 und FBR2 zu PspF hin zeigten und PspA die Region um W56, eine mögliche PspA–Bindestelle auf PspF (Elderkin *et al.*, 2005), kontaktierte. Während sowohl die flach an PspF anliegenden als leicht rotierten PspA–Moleküle ohne erkennbare Interaktion von PspF abdiffundierten (unveröffentlichte Daten), konnte eine senkrechte Positionierung von PspA an PspF identifiziert werden, durch die PspA stabil an PspF verweilte und sich selbst nach einer Simulationszeit von durchschnittlich 138 ns, in der andere PspA–Monomere sich bereits von PspF entfernten und sich die PspA·F-Komplexe teilweise deutlich in der simulierten Einheitszelle bewegten, nicht von PspF löste (Abb. 38, oben). Dieses Ergebnis zeigte sich in 4 unabhängigen Simulationen. In einer Gegenkontrolle wurde PspA 180° um die Längsachse rotiert, sodass PspA — bei gleicher Längsausrichtung an PspF — mit FBR1/FBR2 von PspF abgewandt positioniert war (Abb. 38, unten). Hier konnte keine Interaktion von PspA und PspF nachgewiesen werden, und PspA diffundierte wie in anderen Ansätzen ab.

¹³In Kooperation mit H. Jelger Risselada, MPI für Biophysikalische Chemie, Abteilung Theoretische und Computergestützte Biophysik, Göttingen.

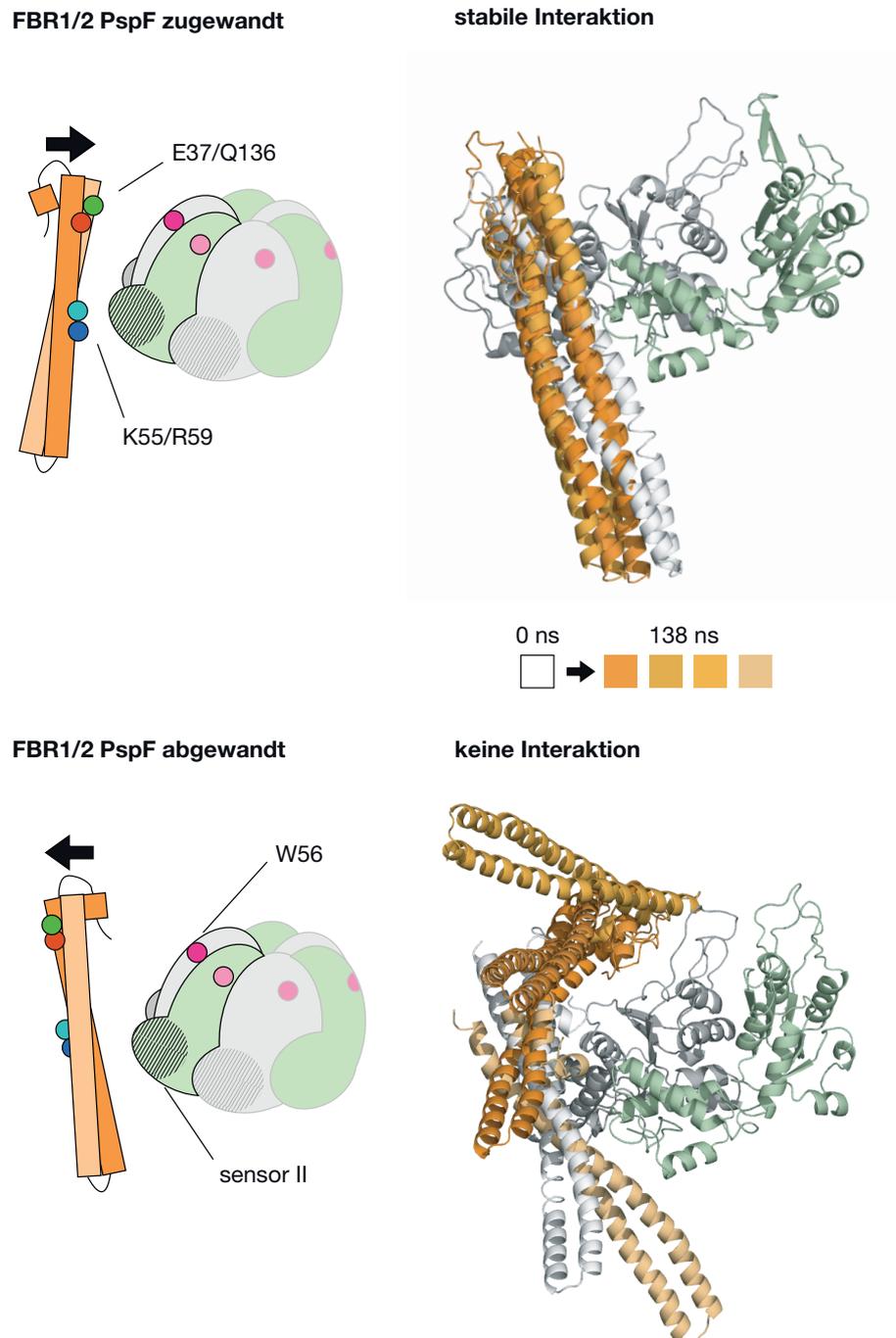


Abbildung 38 Eine senkrechte Orientierung von PspA₁₋₁₄₄ an PspF führt zu einer stabilen Interaktion in atomistischen Simulationen. Simulierte Bindung von PspA an PspF mit FBR1 und FBR2 zu PspF hin orientiert (*oben*), dort bindet PspA stabil an PspF ($n=4$, 138 ns simulierter Zeit) und in gleicher Ausrichtung 180° um die Längsachse gedreht (*unten*, Kontrolle), dort diffundieren die PspA-Moleküle während der Simulation von PspF ab. *Links* jeweils schematische Darstellung des PspF-Hexamers und eines PspA-Monomers, *rechts* die vier überlagerten Endzustände von PspA zum Endpunkt der jeweiligen Simulation sowie die Ausgangsorientierung in weiß. Für weitere Details siehe Haupttext.

In der stabilen Orientierung waren sowohl FBR1 als auch FBR2 in die Bindung an PspF involviert, bemerkenswerter Weise interagierten sie mit unterschiedlichen Protomeren des AAA+-Rings: FBR1 interagierte mit der Region um W56 auf einem PspF-Protomer, FBR2 mit der Oberfläche der Sensor-II-Domäne auf dem angrenzenden PspF. Die Bindung zweier PspF-Protomere durch ein PspA könnte dabei erklären, warum PspA die Bildung von PspF-Hexameren so effektiv zu stabilisieren vermag, und warum sich die Bereiche zur PspF-Bindung auf PspA dazu über eine vergleichsweise lange Distanz erstrecken (müssen) — die Aminosäuren D24 von FBR1 und K59 von FBR2 sind etwa 40 Å von einander entfernt. Auf Basis dieser stabilen PspA-PspF-Interaktion wurde ein PspA·F-Komplex modelliert (Abb. 39). Da die Simulationen mit Komplexen durchgeführt wurden, in denen PspA unter den o.g. Vorannahmen positioniert war, und die Simulationszeit zwar den Eindruck einer stabilen Bindung zwischen PspA und PspF vermittelte, der simulierte Zeitraum jedoch nicht für eine vollständige *In-silico*-Bewertung der Interaktionsstabilität ausreichte, können die Simulationsergebnisse nur als eine Möglichkeit der Interaktion interpretiert werden. In jedem Fall können sie aber aufzeigen, dass die Bildung eines PspA·F-Komplexes über FBR1/FBR2 prinzipiell möglich ist, sodass mit diesen Simulationen auf Basis zweier monomerer Kristallstrukturen die erste molekulare Modellvorstellung des PspA·F-Komplexes erhalten werden konnte.

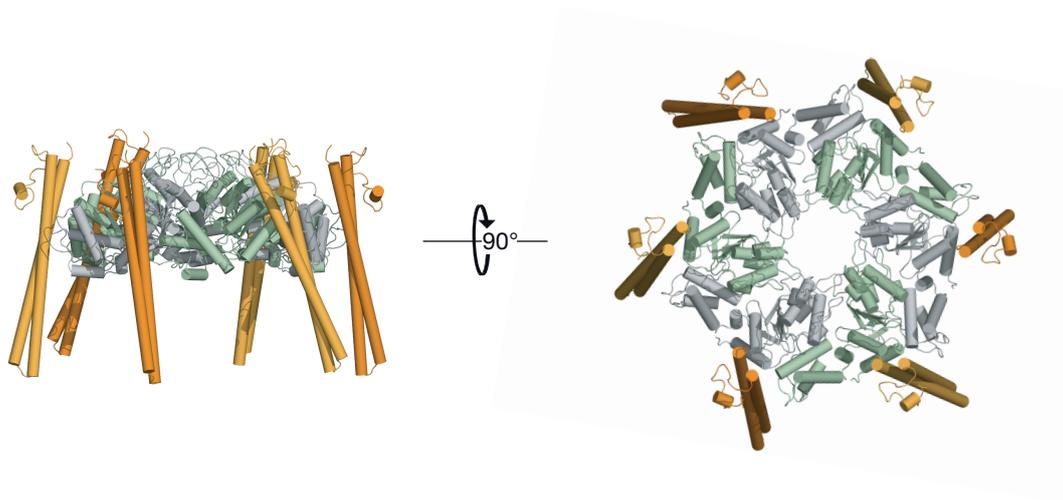


Abbildung 39 Ein möglicher PspA·F-Komplex. Modellierter PspA·F-Komplex nach der in Abb. 38 gezeigten stabilen Interaktion von PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅. PspA-Monomere in *gelb/orange*, PspF-Protomere im Ring abwechselnd *grau* und *grün*.

3.3 Die mögliche Oligomerisierungsdomäne PspA_{160–222}

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Struktur des großen PspA-Fragmentes PspA_{1–144} geklärt, und seine Rolle in der PspF-Bindung und -Regulation beleuchtet werden. Damit waren etwa $\frac{2}{3}$ des Proteins zumindest grundlegend charakterisiert. In diesem Abschnitt werden nun Untersuchungen zum C-terminalen Drittel des Proteins behandelt, welches vermutlich eine zentrale Rolle in der Oligomerisierung des Proteins spielt.

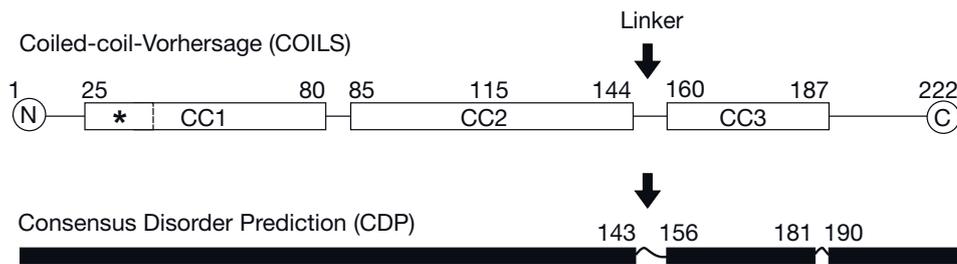
3.3.1 *In-silico*- Analysen zeigen PspA_{160–222} als eigenständige Domäne von PspA

Der etwa 70 Aminosäuren lange C-terminale Bereich von PspA (PspA_{146–222}) enthält als vermutlich zentrales Strukturmerkmal die vorhergesagte *Coiled-coil*-Helix CC3 (vgl. Abb. 5, S.50), die mit 27 Aminosäuren Länge weniger als halb so lang ist wie CC2 (Abb. 40a, oben). Die *Consensus Disorder Prediction*¹⁴ stuft den CC2 und CC3 verbindenden, etwa 15 Aminosäuren langen Bereich als nativ ungefaltete Region ein (Abb. 40a, unten), sodass ihm in PspA mit hoher Wahrscheinlichkeit die Rolle eines Linkers zukommt. Dies geht auch aus den Fragmentationsstudien hervor (Abb. 6, S.51), in denen das den Linker enthaltende Fragment (PspA_{1–160}) ebenso effektiv in der *psp*-Inhibition war wie PspA_{1–144}, und erst mit Hinzunahme eines Abschnittes von CC3 (PspA_{1–168}) die Inhibition verschlechtert wurde. Da CC1 und CC2 eine stabil gefaltete und in sich abgeschlossene Domäne bilden, ist der C-terminale Bereich um CC3 und den C-Terminus (CTR) daher vermutlich eine weitere Domäne von PspA mit distinkter Funktion (Abb. 40b).¹⁵

¹⁴Consensus der Algorithmen COILS, REM465, HOTLOOPS, disopred und GLOBPIPE; Burnham Institute for Medical Research

¹⁵ Bisherige Untersuchungen zum PspA beschäftigten sich nur am Rande mit diesem Bereich (Elderkin *et al.*, 2002; Elderkin *et al.*, 2005; Joly *et al.*, 2009). Durch die Fragmentierung von PspA anhand der dort postulierten helikalen Domänen (vgl. Abb. 5, S.50), ist CC3 in einem Fragment zusammen mit der Hälfte von CC2 und dem Linker untersucht worden. Für H4 (CTR in dem in dieser Arbeit etablierten Modell) wurde eine destabilisierende Rolle in der PspF-Regulation angenommen (Elderkin *et al.*, 2005).

a



b

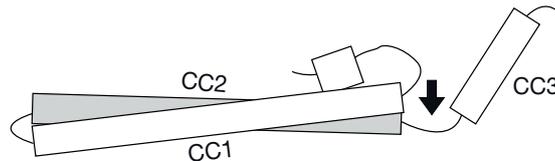


Abbildung 40 *In-silico*-Vorhersage eines Linkers zwischen der PspF-Bindedomäne und CC3. (a) *Coiled-coil*-Vorhersage (COILS, vlg. Abb. 5) und Consensus Disorder Prediction für PspA (Consensus von COILS, REM465, HOTLOOPS, disopred und GLOBPIPE). Für die Region 143–156 wird ein unstrukturierter Bereich vorhergesagt, vermutlich ein Linker (Pfeil). (b) Modellskizze der Domänenaufteilung mit Linker zwischen CC2 und CC3.

Interessanterweise zeigte der MultiCoil-Algorithmus, der weniger zur generellen Vorhersage von *Coiled-coil*-Regionen, als insbesondere für eine Unterscheidung dimerer und trimerer *Coiled-coils* geeignet ist (Wolf *et al.*, 1997), eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür an, dass CC3 einen homo-trimeren *coiled coil* bildet (Abb. 41a– die Wahrscheinlichkeit für eine dimere CC3 liegt unterhalb 0,1, Daten nicht gezeigt). Diese Hypothese wurde dadurch bestärkt, dass ein von Kammerer *et al.* (2005) in empirischen Untersuchungen gefundenes Aminosäuremotiv, welches typisch für kurze trimere *Coiled-coils* ist, in Proteinen der PspA-Familie konserviert ist:¹⁶ Dieses Motiv, R h x x h E (h– eine beliebige hydrophobe Aminosäure, x– eine beliebige Aminosäure), findet sich prototypisch als R I D Q M E in PspA von *E. coli* (Abb. 41b). In einigen anderen Vertretern der PspA/IM30-Familie findet sich Lysin statt Arginin zu Beginn des Motivs, so auch in VIPP1. Das Motiv existiert nicht zwingend in jedem trimeren *Coiled-coil*, jedoch sind *Coiled-coils* mit diesem Motiv in den allermeisten Fällen Trimere (Kammerer *et al.*, 2005).

¹⁶Eine Ausnahme bilden hier einige YjfJ-ähnliche PspA-Homologe

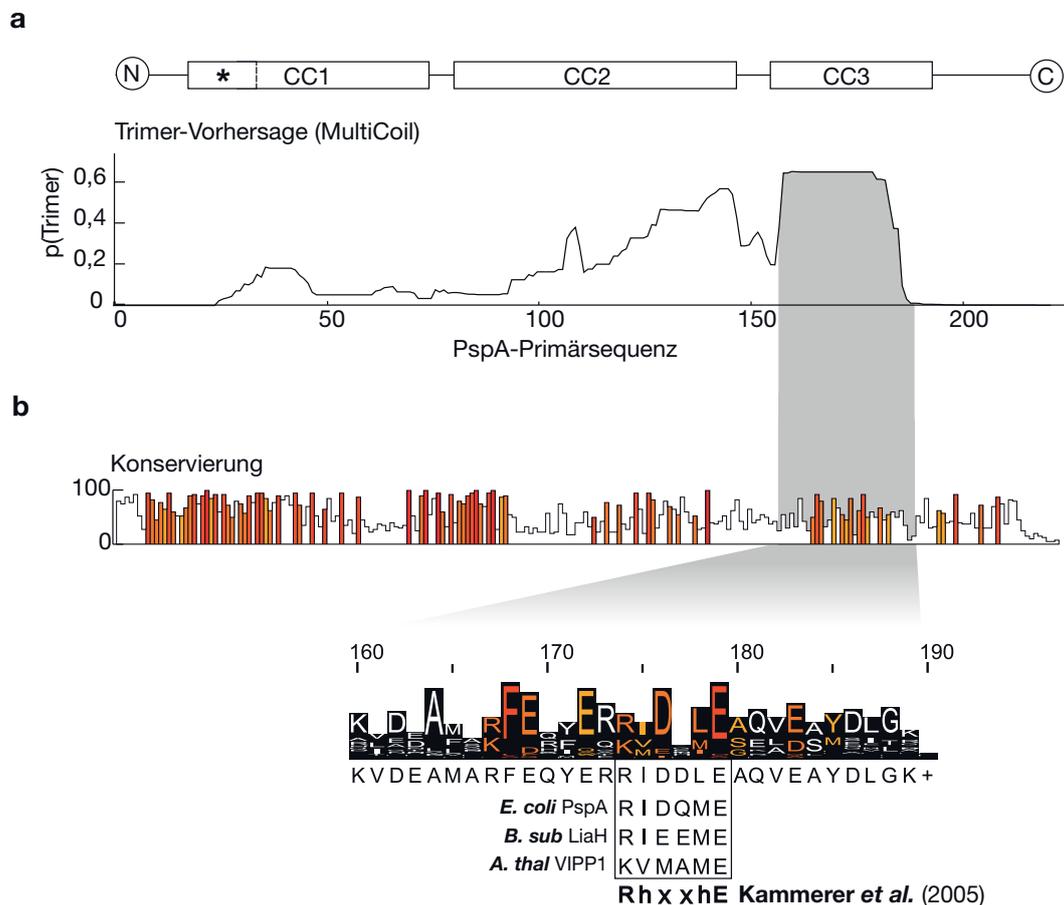


Abbildung 41 *In-silico*- und Sequenz-Analysen deuten auf eine Trimerisierung von CC3 hin (*grau*). (a) Trimerisierungsvorhersage für die Primärsequenz von PspA (MultiCoil), die eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine CC3-Trimerisierung anzeigte (Dimer-Wahrscheinlichkeit dort unter 0,1). COILS-Vorhersage darüber zur Orientierung. (b) Consensus-Histogramm der Aminosäuren in der PspA-Sequenz (γ -Proteobacteria), eingefärbt von *gelb* nach *rot* mit ansteigender Konservierung (JalView). Im C-terminalen Bereich ist der Bereich der CC3 stärker konserviert. Der Detailausschnitt zeigt den Consensus sowie die Primärsequenz der drei PspA-Modellproteine PspA, LiaH und VIPP1 im Vergleich zu einem empirisch gefundenen charakteristischen Trimerisierungsmotiv (Kammerer *et al.*, 2005).

Es ist demnach auf Basis der *In-silico*-Untersuchungen wahrscheinlich, dass es sich bei dem C-terminalen Abschnitt PspA_{160–222} um eine von PspA_{1–144} isolierte Domäne handelt, die durch Selbstinteraktion einen *coiled coil* bildet. Auf Basis dieser Hypothese wurden Fragmente des C-terminalen Bereichs von PspA konstruiert und auf ihre Oligomerisierung hin untersucht.

3.3.2 Fragmente des PspA–C–Terminus sind löslich und bilden homogene Spezies in Gelfiltrationen

Fünf Fragmente von PspA, die alle mindestens CC3 sowie N- bzw. C-terminal weitere Bereiche des Proteins enthielten, wurden mittels Ultrazentrifugation auf ihre zelluläre Lokalisation hin untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass alle detektierbaren Fragmente nahezu vollständig löslich waren, und demnach *in vivo* nicht stabil mit Membranen interagieren (Abb. 42). Dies ist insofern bemerkenswert, als dass somit weder PspA_{1–144} noch PspA_{146–222} *per se* für das Sedimentieren von PspA mit der Membranfraktion verantwortlich zu sein scheinen. Weiterhin wurde deutlich, dass Fragmente ohne intakten C-Terminus in geringerer Menge in der Zelle detektiert werden konnten als solche mit vollständiger C-terminaler Region. Dies kann auf eine höhere Instabilität der Proteine zurückzuführen sein. Daher wurden anschließende *In-vitro*-Untersuchungen mit den beiden stabilsten Fragmenten, PspA_{146–222} und PspA_{160–222} durchgeführt.

Auch diese beiden C-terminalen Fragmente konnten wie zuvor PspA_{1–144} und PspF_{1–265} über Ni-IMAC und einen Anionentauscher bis zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 43). Das Fragment PspA_{146–222} (~10 kDa) zeigte dabei nach der Reinigung zwei Banden nach der Schägger-PAGE. Die Bande des vermutlichen Monomers zeigte sich etwas oberhalb des 10 kDa-Markers (der in der Schägger-PAGE unterhalb seiner eigentlichen Höhe läuft), dazu konnte eine Bande etwa bei 25 kDa nachgewiesen werden. Im Rahmen einer auf diesem Thema betreuten Bachelorarbeit konnte beide Banden in Westernblots mittels anti-His-tag- und anti-PspA-Antikörpern detektiert werden (Lebe, 2013), sodass es sich in beiden

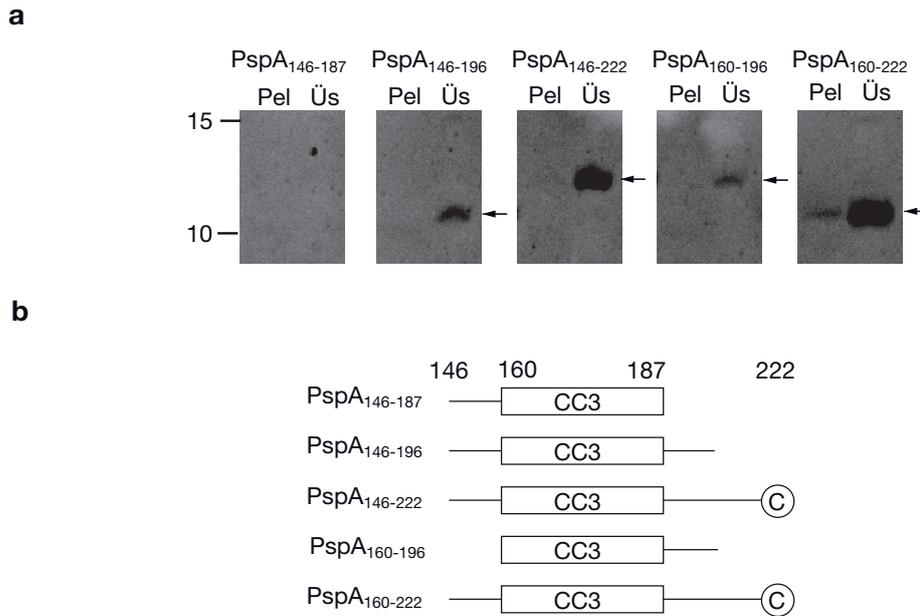


Abbildung 42 Fragmente der C-terminalen Domäne von PspA sind löslich. (a) Lokalisation der fünf in (b) skizzierten Fragmente von PspA nach Ultrazentrifugation (1 h, 130.000 g). Pel– Pelletfraktion, Üs– Überstand. Detektion nach Schägger–PAGE (16-%–Gel) und Westernblot mit anti–His–tag–Antikörpern. Vier der fünf Fragmente konnten detektiert werden, alle in der löslichen Fraktion. Laufhöhe der Fragmente jeweils mit einem Pfeil markiert.

Fällen um PspA_{146–222} handelt. Dies kann als Hinweis auf eine SDS–stabile Oligomerisierung dieser Domäne gesehen werden, jedoch kann es sich hierbei auch um ein SDS–induziertes Artefakt handeln (vgl. Watt *et al.*, 2013).

In der Größenausschluss–Chromatographie eluierte PspA_{160–222} als homogener Peak von der Superdex–200–Säule (Abb. 44). Dessen Elutionsvolumen entsprach etwa einem Protein eines apparenten Molekulargewichts von 30 kDa, und damit der Größe eines Trimers des 10 kDa schweren PspA_{146–222}.

Zusätzlich zu PspA_{146–222} wurde auch das um die Linker–Region verkürzte Fragment PspA_{160–222} gereinigt und mittels Gelfiltration untersucht, es eluierte ebenfalls als homogener Peak, jedoch leicht verzögert im Vergleich zu PspA_{146–222} (Abb. 45a). Das Peakmaximum entsprach einem apparenten Molekulargewicht von 27 kDa, was bei einer Monomergröße des PspA_{160–222} von 8,3 kDa wieder auf einen trimeren Oligomerezustand hindeutete. Da aus Gelfiltrationen bestimmte Proteingrößen nur für globuläre Proteine Gültigkeit besitzen (siehe insbesondere auch das aberrant

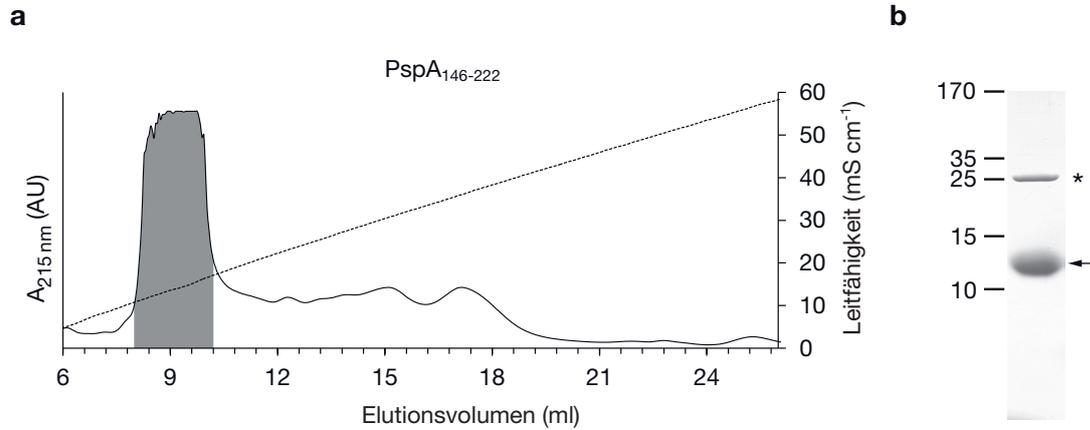


Abbildung 43 Reinigung von PspA_{146–222}. (a) Elutionprofil des Anionentauschers. Nach vorheriger Ni-IMAC-Reinigung und dem Beladen des Ionentauschers (bei ~5 mM NaCl) wurde das Fragment mit einem Salzgradienten (0–1 M NaCl, gestrichelte Linie und rechte Ordinate) von der Säule eluiert. Elutionspeak von PspA_{146–222} grau hinterlegt. (b) Auf einem Schrägger-Gel (16 %) aufgetrennte Elutionsfraktion aus dem Ionentauscher, Coomassie-Färbung. Zu einer Bande auf Höhe des PspA_{146–222}-Monomers (Pfeil) konnte auch eine weitere Bande (mögliches Oligomer) angefärbt werden (*).

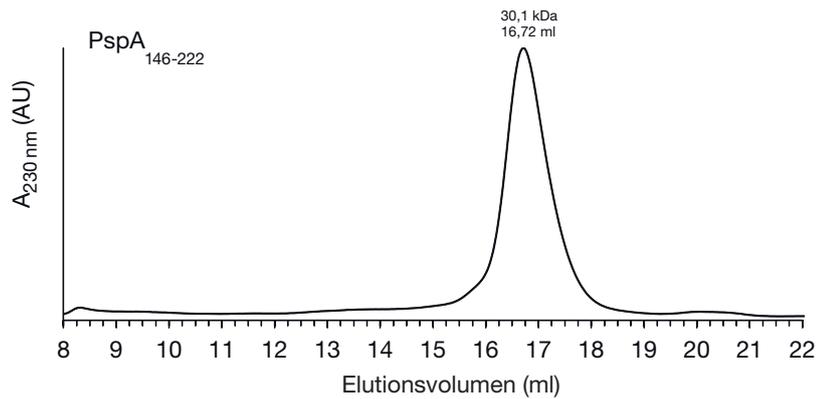


Abbildung 44 PspA_{146–222} eluierte auf Höhe eines Trimers von der Gelfiltrations-säule. Größe des Monomers: 10 kDa; Konzentration etwa 100–200 µM, Detektion bei 230 nm, Superdex 200 10/300 GL.

auf Dimerhöhe eluierende PspA_{1–144}), sind diese apparenten Proteingrößen für die direkte Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von PspA ungeeignet.

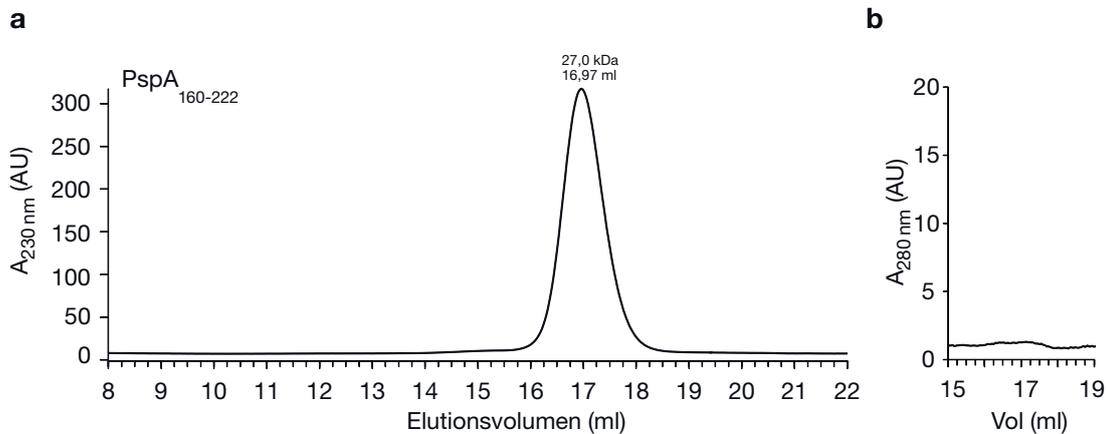


Abbildung 45 PspA_{160–222} eluierte ebenfalls auf Trimer-Höhe von der Gelfiltrationssäule. Größe des Monomers: 8,4 kDa; theoretisches Trimer 25,2 kDa. Konzentration etwa 100–200 μ M. Superdex 200 10/300 GL. (a) Detektion des tryptophan-freien Proteins bei 230 nm. (b) Absorption des Proteins bei 280 nm. Ausschnitt des Bereichs des Elutionspeaks aus (a), es ist keine Detektion des Proteins möglich.

3.3.3 Die mögliche Oligomerisierung von PspA_{160–222} ist sensitiv gegenüber Proteinmodifikationen

Da sowohl PspA_{146–222} als auch PspA_{160–222} in der Gelfiltration gleiches Laufverhalten zeigten, und in PspA_{160–222} die möglicherweise ungefaltete und demnach Strukturaufklärung störende Linker-Region nicht vorhanden war, wurden die weiteren Untersuchungen zur Funktion der C-terminalen Domäne mit diesem Fragment weitergeführt. Ein generelles Problem der Untersuchungen der CC3-Fragmente war, dass in diesem Bereich der Primärsequenz von PspA kein Tryptophan vorhanden ist, und somit keine genaue Konzentrationsbestimmung des Proteins mittels UV-Absorption bei 280 nm möglich war. Alternative Ansätze, wie die Messung der Proteinkonzentration über die Absorption der Phenylalanine oder Bradford-Assays waren erfolglos bzw. sehr ungenau. In geringen Konzentrationen war auch die Coomassie-Färbbarkeit der Fragmente nur sehr schwach, der Grund ist bisher unbekannt.

In einem SEC-Versuch konnte aber diese fehlende Absorption von PspA_{160–222} bei

280 nm ausgenutzt werden (Abb. 45b, Ausschnitt der Absorption bei 280 nm während der in a bei 230 nm detektierten Elution von PspA_{160–222}; absolute AU–Werte für beide Wellenlängen angegeben). Da, wie oben gezeigt, weder PspA_{160–222} noch PspA_{1–144} spontan in größeren Komplexen oligomerisieren bzw. mit Membranen assoziieren, sollte durch Präinkubation beider Fragmente und anschließende Gelfiltration eine mögliche Interaktion der beiden Domänen durch Veränderung des Elutionsverhaltens untersucht werden. Die Elution von PspA_{1–144} konnte dabei ohne weitere Modifikationen bei 280 nm detektiert werden. Das Fragment eluierte als homogener Peak bei 16,3 ml (apparente Größe von 34 kDa), sowohl mit (Abb. 46), als auch ohne Präinkubation mit PspA_{160–222} (nicht gezeigt), sodass zumindest aus den Gelfiltrationsdaten keine stabile Interaktion von PspA_{160–222} und PspA_{1–144} nachgewiesen werden konnte.

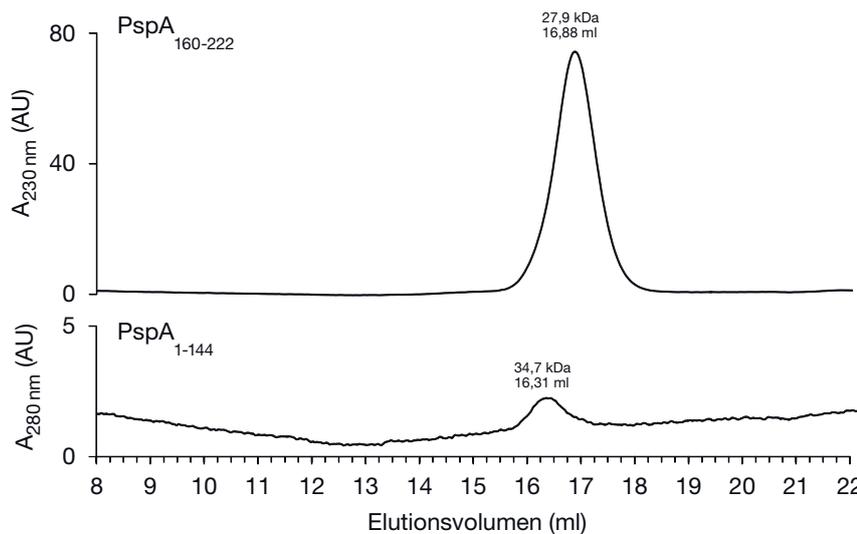


Abbildung 46 PspA_{1–144} und PspA_{160–222} interagieren nicht stabil. Nach Präinkubation (15 min, $\sim 10 \mu\text{M}$ PspA_{1–144} und $\sim 50 \mu\text{M}$ PspA_{160–222} wurden die Proteine in der Gelfiltration aufgetrennt (Superdex 200 10/300 GL). PspA_{1–144} konnte dabei aufgrund seiner Absorption bei 280 nm (unteres Chromatogramm) separat detektiert werden und eluierte in einem homogenen Peak als Monomer (aberrantes Laufverhalten auf Dimerhöhe).

Um in weiteren Studien die Möglichkeit zu besitzen, PspA_{160–222} verlässlich nachweisen zu können, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: So wurde im C–Terminus ein Tryptophan–Linker eingefügt, um das Protein durch eine Absorption bei 280 nm detektierbar zu machen (^WPspA_{160–222}), sowie in einem zweiten Ansatz

der N-Terminus des Fragments *in vitro* mit dem Fluorophor Atto488 markiert (^{Atto}PspA_{160–222}). Die Experimente mit den beiden modifizierten PspA_{160–222}-Varianten deuteten darauf hin, dass PspA_{160–222} zwar in der Lage zu sein scheint zu oligomerisieren, die Modifikationen des Proteins sich jedoch negativ auf seine Stabilität und Oligomerbildung auszuwirken scheinen.

AUC-Messungen deuten auf größtenteils monomeres ^WPspA_{160–222} hin

Um den Oligomerisationszustand von PspA_{160–222} zu bestimmen, wurden mittels Analytischer Ultrazentrifugation Gleichgewichtssedimentations-Messungen mit dem tryptophan-markierten ^WPspA_{160–222} durchgeführt (Abb. 47a).

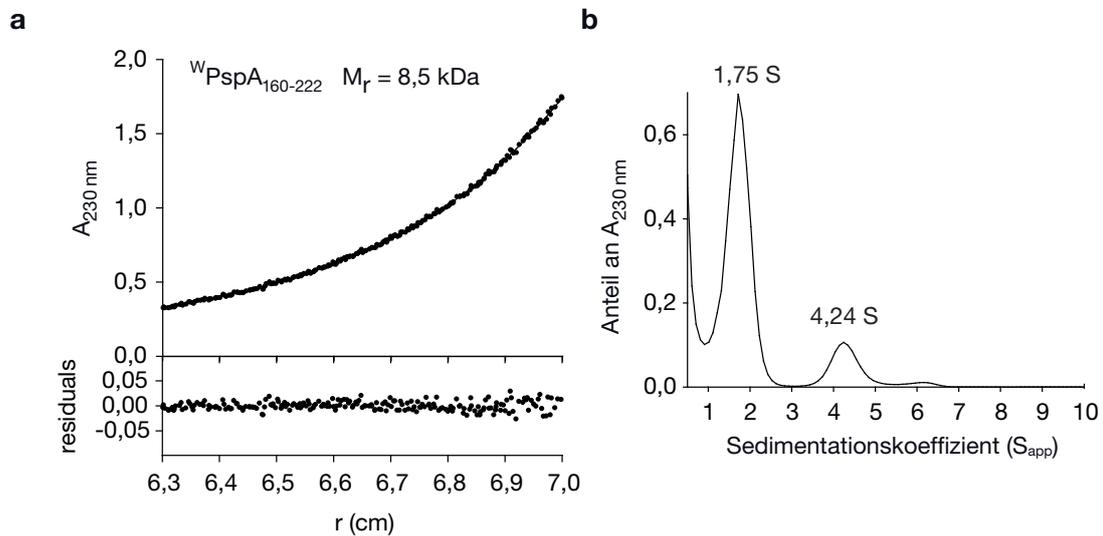


Abbildung 47 ^WPspA_{160–222} ist größtenteils monomer in der Analytischen Ultrazentrifugation. (a) Die Verteilung von tryptophan-markiertem PspA_{160–222} im Sedimentationsgleichgewicht (nach 30 h) entspricht der eines Monomers. (b) Während Sedimentationsgeschwindigkeitsmessungen (1 h) konnte neben der dominanten Monomerspezies auch eine größere Oligomerspezies nachgewiesen werden, die schneller sedimentierte.

Das Sedimentationsgleichgewicht entsprach dabei nach 30 h dem eines Monomers, sodass hier keine Oligomerisierung erkennbar wurde. Jedoch zeigte sich nach 30 h eine Veränderung innerhalb der Probe (Abweichung der Spektren vom isosbestischen Punkt; persönliche Kommunikation, Hauke Lilie), sodass Abbau- oder Aggregationsvorgänge in der Probe zu beginnen schienen. ^WPspA_{160–222} konnte zuvor auch in nur verhältnismäßig geringen Mengen aus *E. coli* gereinigt werden, sodass die Tryptophan-Modifikation das Protein möglicherweise destabilisiert. Wurde hinge-

gen die Sedimentationsgeschwindigkeit von $^W\text{PspA}_{160-222}$ verfolgt (1 h), konnte die Bildung zweier Spezies durch das Protein beobachtet werden (Abb. 47b). Auch hier zeigte sich $^W\text{PspA}_{160-222}$ zum überwiegenden Teil als Monomer, jedoch war auch eine deutlich schneller sedimentierende, distinkte Oligomerspezies erkennbar.

$^{\text{Atto}}\text{PspA}_{160-222}$ oligomerisiert stabil in Mischkomplexen

Das aufgrund seiner N-terminalen Fluoreszenzmarkierung auch in geringen Mengen nachweisbare $^{\text{Atto}}\text{PspA}_{160-222}$ zeigte — als erstes C-terminales PspA-Fragment überhaupt — ein verändertes Laufverhalten in Gelfiltrationsexperimenten und eluierte deutlich später als unmarkiertes $\text{PspA}_{160-222}$ von der Superdex-200-Säule (bei 17,94 statt 16,97 ml, Abb. 48a), was auf einen niedrigeren Oligomerisierungszustand des Atto-markierten Proteins gegenüber dem unmarkierten hindeutete. Die Untersuchung des Sedimentationsgleichgewichtes von ($^{\text{Atto}}\text{PspA}_{160-222}$) mittels AUC bestätigten, dass diese modifizierte Variante im Gleichgewicht ebenfalls als Monomer vorliegt (persönliche Kommunikation, Hauke Lilie), sodass der Peak dieser PspA-Variante in der SEC wahrscheinlich dem Monomer von $^{\text{Atto}}\text{PspA}_{160-222}$ zugeordnet werden kann.

Bemerkenswerterweise eluierte $^{\text{Atto}}\text{PspA}_{160-222}$ nach Mischung mit $\text{PspA}_{160-222}$ bei 16,93 ml und damit auf Höhe des unmarkierten $\text{PspA}_{160-222}$ (Abb. 48b, vgl. auch Abb. 45 S.109), was stark darauf hindeutet, dass es sich bei den in einem Elutionspeak um ~ 30 kDa eluierenden Fragmenten $\text{PspA}_{146-222}$ und $\text{PspA}_{160-222}$ tatsächlich um Oligomere dieser Domäne handelt. Darüber hinaus wurde durch diese Experimente deutlich, dass N- und C-terminale Modifikationen zwar die Detektion der ansonsten schwer nachweisbaren Fragmente verbessern, sich aber massiv auf die Oligomerisierung von PspA auswirken. Da das N-terminale Fluorophor in $\text{PspA}_{160-222}$ direkt am Beginn der CC3 lokalisiert ist, scheint die Existenz mehrerer Fluorophore hier die Ausbildung des *Coiled-coils* zu behindern, bzw. seine Destabilisierung zu fördern. Für das C-terminal eingeführte Tryptophan in $^W\text{PspA}_{160-222}$ ist ein ähnlicher Einfluss auf die Stabilität denkbar. Wie bereits für N-terminale Modifikationen von PspA_{1-144} diskutiert, die zu einem Verlust der PspF-Interaktion führten, muss also auch für die in Lokalisationsstudien verwen-

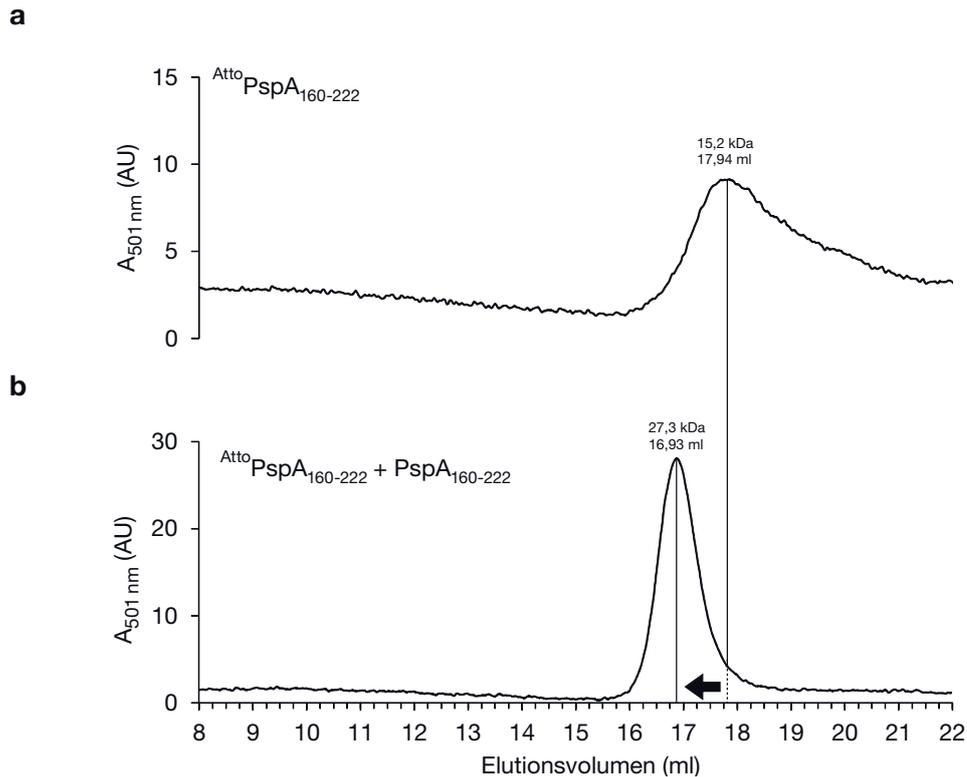


Abbildung 48 Elution von ^{Atto}PspA₁₆₀₋₂₂₂ auf Oligomerhöhe nach Mischung mit unmarkiertem PspA₁₆₀₋₂₂₂. **(a)** Atto488-markiertes PspA₁₆₀₋₂₂₂ eluiert nicht mehr auf Höhe eines apparenten Trimers von der Gelfiltrationssäule (vgl. Abb. 45). **(b)** Durch Präinkubation mit unmarkiertem PspA₁₆₀₋₂₂₂ (~10–15-facher Überschuss des unmarkierten) eluierte ^{Atto}PspA₁₆₀₋₂₂₂ jedoch auf Höhe eines apparenten Trimers. Nachweis von Atto488 über die Absorption des Fluorophors bei 501 nm. Superdex 200 10/300 GL.

3 Ergebnisse

deten, C-terminalen Fusionen von PspA (PspA-GFP; Yamaguchi *et al.*, 2013) mit einer Veränderung des natürlichen Verhaltens von PspA *in vivo* gerechnet werden, und die Aussagen dieser Studien unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden.

Insgesamt betrachtet konnte mit den beschriebenen Experimenten eine funktionelle Einordnung des C-terminalen Drittels von PspA geschehen, sowie die Homo-Oligomerisierung von PspA über diese distinkte C-terminale Domäne ansatzweise gezeigt werden.

3.4 Das Yjf–System von *E. coli*

E. coli besitzt neben PspA ein weiteres Protein der PspA/IM30–Familie, YjfJ. Dies ist kein Einzelfall, da die Existenz multipler PspA–Proteine für eine Vielzahl von Organismen bekannt bzw. vorhergesagt ist (siehe 1.2, S. 10). Neben der Charakterisierung von PspA, die in den vorhergehenden Abschnitten behandelt wurde und den Schwerpunkt der Arbeit darstellte, wurden daher auch Experimente zur grundlegenden molekularen und biochemischen Charakterisierung von YjfJ und eines möglichen Yjf–Systems durchgeführt. Hierbei wurde die hohe strukturelle Ähnlichkeit von PspA und YjfJ deutlich, sowie zwei Interaktionspartner von YjfJ identifiziert: Das im vermutlichen *yjf*–Operon codierte, konservierte YjfI, sowie — unerwarteterweise — der Regulator des *psp*–Systems, PspF.¹⁷

3.4.1 YjfJ ist ein PspF–interagierendes PspA–Homolog von *E. coli*

Die Überproduktion von YjfJ in einem $\Delta pspA$ –Reporterstamm führte zu einer unerwarteten Senkung des *psp*–Reporterlevels auf $\sim 50\%$ der uninhibierten Aktivität (Abb. 49a). Aufgrund des Fehlens des endogenen PspAs zur PspF–Inhibition deutete dies auf eine direkte Regulation von PspF durch YjfJ hin.

Weitere Untersuchungen mit *psp*–Deletionsstämmen zeigten darüber hinaus, dass die Inhibition nur in einem $\Delta pspA$ –Hintergrund auftritt (Abb. 49b). Im Übrigen verhielt sich YjfJ bei Überproduktion wie PspA (vgl. Abb. 9, S. 54) und induzierte das System im WT– und $\Delta pspG$ –Reporter, wenn auch schwächer. Im Rahmen einer Bachelorarbeit (Klaus, 2013) konnte gezeigt werden, dass YjfJ — wie vorhergesagt — in seinen strukturellen Charakteristika mit PspA übereinstimmt. So wurde für YjfJ u.a. die Bildung der bereits durch Standar *et al.* (2008) für PspA beschriebenen Oligomerformen gezeigt und mittels Circular dichroismus–Spektroskopie auf einen

¹⁷Einzelne vom Autoren dieser Arbeit untersuchte Aspekte auf dem Gebiet des Yjf–Systems wurden im Rahmen von ihm betreuter Bachelorarbeiten vertieft (Klaus, 2013; Terhorst, 2014; Böhl, 2014), und aus ihnen erhaltene Ansätze von ihm weiterentwickelt. Um den durchgehenden Faden der auf diesem Gebiet durchgeführten Forschung darstellen zu können, sind daher an einigen Stellen zentrale Ergebnisse einzelner Bachelorarbeiten unter Kenntlichmachung ihres Ursprungs in Text angeführt.

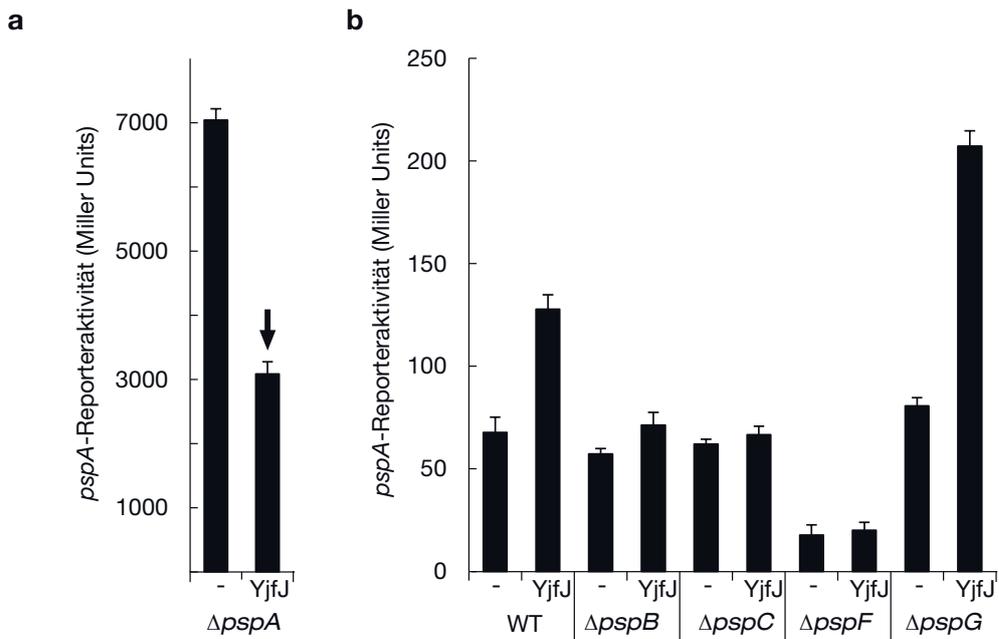


Abbildung 49 YjfJ ist ein Regulator des *psp*-Systems. LacZ-Aktivitätsstudien mit Δpsp -Reporterstämmen ohne (-) oder mit Überproduktion von YjfJ. (a) YjfJ führte im $\Delta pspA$ -Reporterstamm zu einer Senkung des Psp-Levels um 50 % (Pfeil). (b) In einem WT-Reporterstamm und den anderen Deletionsstämmen führt YjfJ nicht zur Inhibition und zeigte ansonsten ähnliche Effekte wie PspA-Überproduktion.

hohen Anteil an α -Helices im Protein geschlossen werden. Außerdem konnte die Hypothese einer direkten YjfJ-PspF-Interaktion in Co-Elutionsstudien bestätigt werden (alle Klaus, 2013), sodass es sich bei YjfJ um einen zweiten Regulator des *psp*-Systems handelt, ein bisher nicht beobachtetes Phänomen.

Auf Grundlage der für PspA identifizierte FBR1 (Abschnitt 3.1.3, S.62) wurden ähnliche Austausche in YjfJ eingeführt und ihr Effekt auf die Reporteraktivität in einem $\Delta pspA$ -Reporterstamm untersucht (Abb. 50). Drei der Austausche (Q33A und D37A auf CC1, V142A auf CC2) führten zu fast vollständigem Verlust der Inhibition von PspF, sodass hier die Bildung einer FBR1-ähnlichen Region durch die ausgetauschten Aminosäuren wahrscheinlich ist. Allerdings können sekundäre Effekte wie eine Destabilisierung von YjfJ zu einem ähnlichen Inhibitions-Verlust führen, sodass diese Varianten von YjfJ in zukünftigen Studien genauer charakterisiert werden müssen. Bemerkenswerterweise wird das mutmaßliche Yjf-System nicht durch PspF reguliert (Bury-Moné *et al.*, 2009), sodass YjfJ damit in die Selbstregulation des *psp*-Systems eingreift.

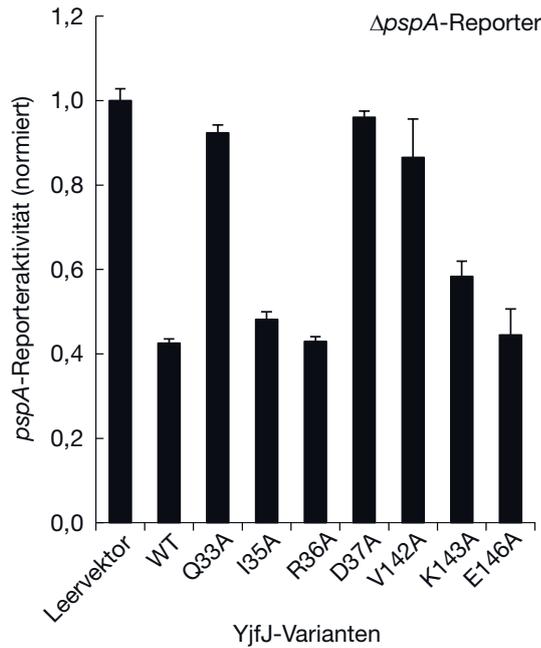


Abbildung 50 Aminosäuren–Austausche in der FBR1–ähnlichen Region von YjfJ stören die *psp*–Inhibition. Veränderungen der LacZ–Aktivität des Δ *pspA*–Reporterstammes bei YjfJ–Überproduktion durch die angegebenen Einzelaminosäureaustausche in YjfJ. Normiert auf die Leervektorkontrolle. Unverändertes YjfJ (WT) als Kontrolle mitgeführt.

3.4.2 Das konservierte, dimere YjfI ist ein cytoplasmatischer Interaktionspartner von YjfJ

YjfJ konstituiert möglicherweise ein Operon mit den umliegenden Genen, unter ihnen *yjfI*, *yjfK*, *yjfL*. Der genetische Kontext ist hierbei nur für *yjfI* und das 3' von ihm liegende *yjfJ* konserviert, diese beiden Gene finden sich in gleicher Organisation aber anderem genetischen Umfeld auch in *Pseudomonas aeruginosa* (Macé *et al.*, 2008). Eine Untersuchung möglicher Interaktionspartner von YjfJ mittels Co–Elutionsexperimenten zeigte, dass YjfJ stabil mit YjfI interagiert, da YjfJ–Strep mit YjfI–His von Ni–NTA–Säulen eluiert werden konnte (Abb. 51a), und dass YjfI größtenteils cytoplasmatisch in der Zelle lokalisiert ist (Abb. 51b).

Eine Interaktion von YjfJ mit den Proteinen YjfK und YjfL konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 52 zeigt beispielhaft das cytoplasmatisch lokalisierte aber nicht YjfJ co–eluiierende YjfK).

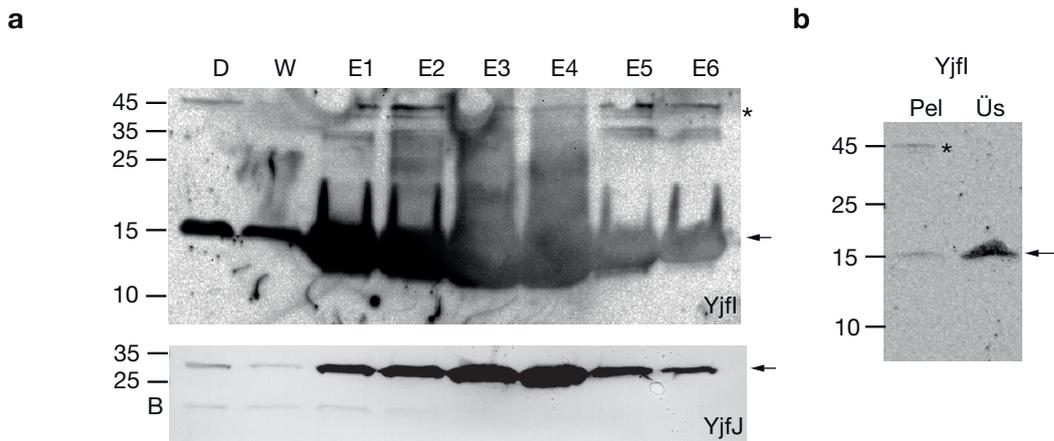


Abbildung 51 YjfJ und YjfI interagieren stabil in Co-Elutionsstudien. (a) Immunodetektion von YjfI-His (16 kDa; oben, ECL) und YjfJ-Strep (25 kDa; unten, AP) in Proben des Durchlaufs (D), der letzten Waschfraktion (W) und den Elutionsfraktionen (E1-6) einer Ni-IMAC. B- BCCP-Signal durch das Streptactin-AP-Konjugat. Schägger-Gel (16 % — dadurch leicht veränderte Migrationsgeschwindigkeit der Markerproteine), Westernblot (anti-His-tag-Antikörper, anti-Streptactin-Konjugat), Proben der Wasch- und Elutionsfraktionen 5-fach konzentriert. Monomerhöhe in allen Fällen mit Pfeilen markiert. Für weitere Details siehe Materialien und Methoden (S. 42) (b) YjfI ist ein cytoplasmatisches Protein. Lokalisation durch Ultrazentrifugation (1 h, 130.000 g). Pel- Pelletfraktion, Üs- Überstand. Detektion nach Schägger-PAGE (16-%-Gel) und Westernblot mit anti-His-tag-Antikörpern. Auf den Blots ist mindestens eine weitere YjfI-Bande (~45 kDa, *) zu erkennen, die auf eine mögliche Oligomerisierung hindeutet.

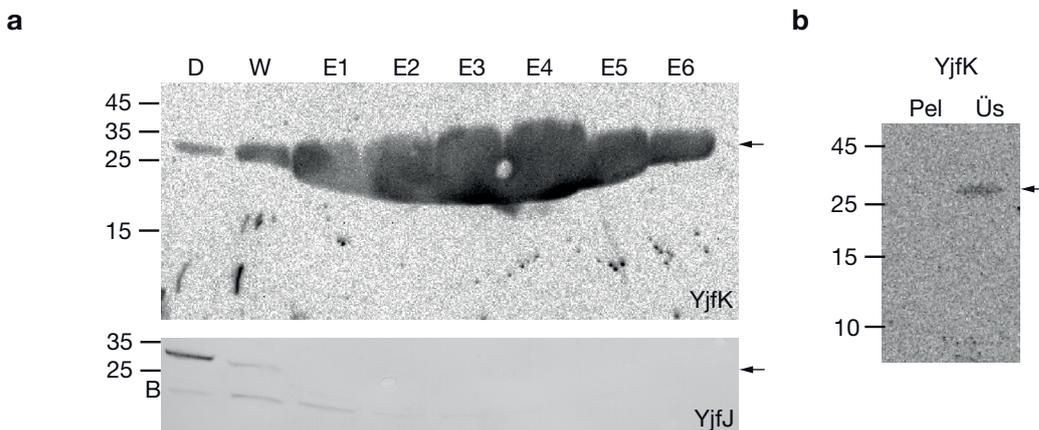


Abbildung 52 Bei einer Ni-IMAC-Anreicherung von YjfK-His co-eluiert YjfJ nicht. (a) Immunodetektion von YjfK-His (25 kDa; oben, ECL) und YjfJ-strep (25 kDa; unten, AP). (b) YjfK ist ein cytoplasmatisches Protein. Lokalisation durch Ultrazentrifugation. Pel- Pelletfraktion, Üs- Überstand. Weitere Details wie in Abbildung 51 beschrieben. Laufhöhe der Proteine jeweils mit einem Pfeil markiert.

In der Bachelorarbeit von Böhl (2014) konnte durch Co–Elutionsstudien mit Fragmenten von YjfJ zudem gezeigt werden, dass Yjfl mit dem C–terminalen Bereich von YjfJ interagiert (entspricht CC3 in PspA).

Da Yjfl nach Schägger–PAGE und Westernblot eine deutliche erkennbare Oligomerbande zeigte¹⁸ (Abb. 51,*), wurde das Protein gereinigt und *in vitro* auf eine mögliche Oligomerisierung hin untersucht. Messungen mittels Analytischer Ultrazentrifugation ergaben hier, dass Yjfl eine homogene Spezies bildet, die einem Yjfl–Dimer entspricht (Abb. 53).

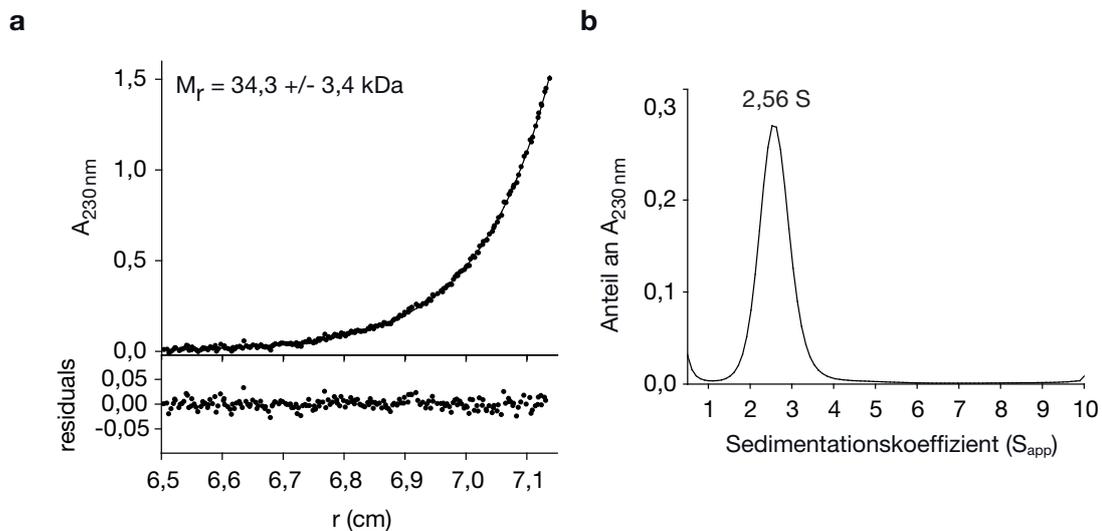


Abbildung 53 Yjfl bildet ein Homo–Dimer. Analytische Ultrazentrifugation. (a) Die Verteilung Yjfl im Sedimentationsgleichgewicht (nach 30 h) entspricht der eines Dimers (Monomergröße 16 kDa). (b) In Sedimentationsgeschwindigkeitsmessungen (1 h) sedimentierte Yjfl ebenfalls als homogene Dimerspezies.

In diesen grundlegenden Arbeiten zum PspA–Homolog YjfJ konnten somit zwei cytoplasmatische Interaktionspartner dieses Proteins, Yjfl und PspF, identifiziert werden. Die beiden Proteine binden an unterschiedliche Domänen von YjfJ: das dimerische Yjfl interagiert mit der C–terminalen Domäne von YjfJ (ähnlich PspA_{160–222}), PspF hingegen mit der N–terminalen PspA_{1–144}–ähnlichen Domäne (gesetzt den Fall dass YjfJ und PspA auf ähnliche Weise mit PspF interagieren, und darauf deuten sowohl die hohe strukturelle Ähnlichkeit als auch die FBR1–Austausche in YjfJ hin). In zukünftigen Studien muss die Interaktion von Yjfl und YjfJ näher

¹⁸Homo–Oligomerisierung von Yjfl wurde auch in der Bachelorarbeit von Terhorst (2014) mittels Co–Elution gezeigt

3 Ergebnisse

untersucht werden, um die Funktionen des Yjfl·J-Komplexes näher zu charakterisieren, und damit die Frage, warum Organismen mehrere *psp*-Systeme besitzen, beantworten zu können.

4 Diskussion

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand das *phage shock protein A*. Da dieses Protein aufgrund verschiedener Eigenheiten wie u.a. der Feedback-Regulation (Dworkin *et al.*, 2000) und seiner Tendenz zur spontanen Oligomerisierung (Yamaguchi *et al.*, 2010) experimentell schwer zugänglich ist, erfolgte die Bearbeitung dieses Vorhabens parallel *in vivo*, *in vitro* sowie *in silico*, um ein Gesamtbild dieses Proteins in mehreren experimentellen Dimensionen zeichnen zu können. In der folgenden Diskussion wird zuerst ein mechanistisches Modell des PspA·F-Komplexes und der durch ihn möglichen *psp*-Regulation aus den Charakterisierungen von PspA₁₋₁₄₄ und der PspA-PspF-Interaktion erarbeitet, und dieses dann mit dem aktuell diskutierten Regulations-Modell des *psp*-Systems verglichen. In den weiteren Abschnitten wird eine mögliche Oligomerstruktur von PspA auf Basis der Oligomerisierungsdomäne PspA₁₆₀₋₂₂₂ und der PspA₁₋₁₄₄-Struktur entworfen, sowie ihre Relevanz im Vergleich zu den für PspA bekannten Oligomerstrukturen diskutiert, bevor die Arbeit mit einem Ausblick auf zukünftig zentrale Forschungsschwerpunkte schließt.

4.1 PspA₁₋₁₄₄ und der PspA·F-Komplex – ein neues Modell der *psp*-Regulation

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die erste biochemische Charakterisierung des PspA·F-Komplexes unter annähernd physiologischen Bedingungen, und die erste Untersuchung der PspA-PspF-Interaktionskinetik überhaupt. Dabei wurden bisher veröffentlichte Daten zur Komplex-Stoichiometrie (Joly *et al.*, 2009) und zur inhibitorischen Wirkung von PspA auf die PspF-ATPase (Dworkin *et al.*, 2000; Elderkin *et al.*, 2002; Elderkin *et al.*, 2005) teilweise bestätigt. So konnte sowohl der auf Gelfiltrationsdaten basierende 6:6-Komplex von PspA und PspF im Gleichgewicht (AUC) nachgewiesen, als auch die ATPase-inhibitorische Funktion von PspA gezeigt werden. Darüber hinausgehende Untersuchungen erlaubten die

biochemische Charakterisierung des PspA·F-Komplexes unter nahezu physiologischen Proteinkonzentrationen, und die Kristallstruktur von PspA₁₋₁₄₄ zeigte unerwartete strukturelle Parallelen zwischen PspA·F und der Disaggregase ClpB auf. Dieser Fortschritt im Verständnis der PspA·F-Regulation wurde insbesondere aufgrund des neu identifizierten PspA-Fragments PspA₁₋₁₄₄ erreicht.

Das PspA-Fragment PspA₁₋₁₄₄ als neuer experimenteller Standard für die In-vitro-Untersuchung des *psp*-Systems

Ein Großteil der Untersuchungen zu PspA und der PspA-PspF-Interaktion wurde mit dem Fragment PspA₁₋₁₄₄ durchgeführt, welches zuvor *in vivo* als minimales PspF-inhibierendes Fragment von PspA ermittelt werden konnte. Durch die gewählten Anzuchtbedingungen, insbesondere die lange Induktionsdauer, wurden membran-interagierende und oligomerisierende Fragmente von PspA (wie das bisher für *In-vitro*-Studien herangezogene PspA₁₋₁₈₆) ausselektiert, sodass mögliche sekundäre Effekte (insbesondere Aggregation/Oligomerisierung) während der *In-vitro*-Studien nahezu ausgeschlossen werden konnten. Für das bisher am häufigsten in *In-vitro*-Studien verwendete PspA₁₋₁₈₆ (Zhang *et al.*, 2013; Joly *et al.*, 2009; Elderkin *et al.*, 2005) wurde das Detergenz CHAPS zur Reinigung aus Membranfraktionen benötigt (Elderkin *et al.*, 2002), sodass eine Aggregationsanfälligkeit bzw. Tendenz zur Oligomerisierung für dieses und andere bisher untersuchte Fragmente von PspA zu bestehen scheint. Ein Hauptgrund dafür scheint in der Auswahl der Fragmentierungspunkte in PspA zu liegen (basierend auf Elderkin *et al.*, 2002, vgl. Abb. 5), welche innerhalb der *Coiled-coil*-Helices liegen, und somit diese Domäne artifiziell destabilisieren. Die hohe Stabilität von PspA₁₋₁₄₄ gegenüber anderen Fragmenten ist wahrscheinlich auch der Grund dafür, dass mit ihm die erste Kristallstruktur eines Proteins der PspA/IM30-Familie gelöst werden konnte. Ebenso gelang eine detaillierte Charakterisierung des durch PspA₁₋₁₄₄ und PspF₁₋₂₆₅ gebildeten PspA·F-Komplexes. *In vivo* scheint die PspF-Regulation durch dieses Fragment äquivalent zu WT-PspA zu funktionieren (gleiche Effekte von Austausch in FBR1, vgl. Abb. 16, S.66 und Abb. 15, S.64), nur ohne gleichzeitige Oligomerbildung/Membraninteraktion (siehe zu diesem Punkt auch

Abschnitt 4.2), sodass die mit den Fragmenten PspA_{1–144} und PspF_{1–265} *in vitro* erhaltenen Ergebnisse auch für Interaktionen der beiden Vollängen-Proteine *in vivo* ihre Aussagekraft behalten sollten. Somit steht mit PspA_{1–144} nun zum ersten mal ein ausschließlich cytoplasmatisches, stabiles und strukturell charakterisiertes Fragment von PspA zur Verfügung.

4.1.1 PspA·F und ClpB — die konvergente Evolution einer *Coiled-coil*-abhängigen AAA+-Regulation

PspA_{1–144} und die M-Domäne der AAA+-Disaggregase ClpB (ClpB-MD) zeichnet eine hohe sekundärstrukturelle Ähnlichkeit aus, wie bereits unter 3.2.6 in Grundzügen gezeigt. Diese ist umso bemerkenswerter, als ClpB-MD *cis*-agierend und daher kovalent mit der zu regulierenden AAA+-Domäne fusioniert ist (Abb. 54), während PspA seine regulatorische Funktion in *trans* ausübt.

ClpB



Abbildung 54 Modelliertes Hexamer der monomeren Kristallstruktur von ClpB aus *T. thermophilus*. M-Domäne in dunkelgrau, die AAA+-Protomere abwechselnd in weiß und hellgrau (PDB-ID: H4SE).

Die daraus resultierende, unterschiedliche Abfolge und Aufteilung der an der *Coiled-coil*-Domäne beteiligten Helices (vgl. Ab.37, S.98) bei gleichzeitig nicht konservierter Primärstruktur deutet darauf hin, dass sich in einer konvergenten Evolution eine ähnliche Lösung zur Regulation zweier AAA+-Domänen entwickelt hat. Bei näherer Betrachtung, welche erst durch die in dieser Arbeit gezeigte

strukturellen Charakterisierung von PspA₁₋₁₄₄ sowie die Identifizierung der PspF-regulierenden Regionen ermöglicht wird, zeigt sich eine über strukturelle Aspekte hinausgehende, funktionale Ähnlichkeit beider Domänen. So stabilisieren sowohl PspA (diese Arbeit; Joly *et al.*, 2009) als auch ClpB-MD (Watanabe *et al.*, 2009) die hexamere Form ihrer AAA+-ATPasen. Wie im Falle von PspA, dessen Abwesenheit eine etwa 10-fach erhöhte ATPase-Aktivität von PspF (Abb. 33, S.90) sowie eine erhöhte Psp-Transkriptionsrate zur Folge hat (Abb. 8, S.53), führt die Deletion der M-Domäne zu steigender Aktivität von ClpB (~30-fache Disaggregase-Aktivität; Seyffer *et al.*, 2012). ClpB zeigt dazu (wie PspA·F) eine basale ATPase-Aktivität (Haslberger *et al.*, 2007), sodass sich die Stabilisierung und Inhibierung der regulierten ATPase als Hexamer, sowie die Modulation des basalen ATPase-Levels als zentrale Funktionen der beiden *Coiled-coil*-Domänen identifizieren lassen.

Diese scheinen zudem über einen auch im Detail ähnlichen Mechanismus realisiert zu werden: Wie der Strukturvergleich zeigt, befindet sich FBR2 auf PspA dort, wo ClpB-MD über zwei Linker an AAA-1 fusioniert ist (von der AAA+-Domäne hin zu H1 sowie von H4 zurück zu AAA-1; Abb. 55a, *türkis*). So scheint über diese Region in beiden Proteinen eine Interaktion mit der AAA+-Domäne stattzufinden, wobei sich dies für ClpB-MD aus der kovalenten Verbindung ergibt, und für FBR2 die regulatorischen Effekte *in vivo* und *in vitro* eine direkte Interaktion ebenfalls wahrscheinlich machen.

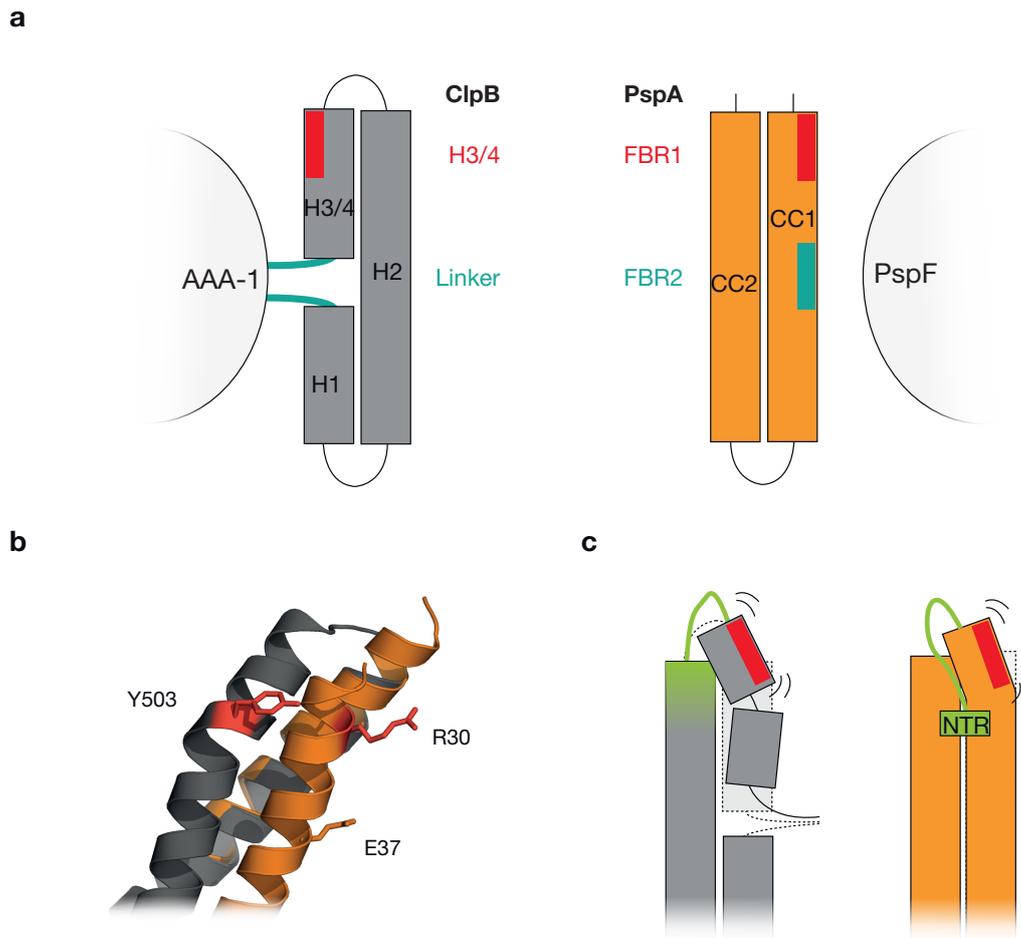


Abbildung 55 Die M-Domäne von ClpB und PspA zeigen übereinstimmende Struktur- und Funktionsmerkmale. (a) Schematische Übersicht über die helikalen Bereiche beider Proteine sowie die konservierten Interaktionsstellen mit ihren AAA+-Domänen, *türkis*-FBR2 in PspA bzw. Linker in ClpB; *rot*- FBR1 bzw. H3/4 in ClpB. (b) Im strukturellen Alignment beider Proteine (vgl. Abb. 37, S.98) sind mit Y503 (ClpB) sowie R30 (PspA) zwei Aminosäuren hervorgehoben, deren Austausch zu einer Aktivitätssteigerung der AAA+-ATPase führt. Beide Aminosäuren liegen in gleicher Richtung orientiert auf dem *Coiled-coil*. E37 auf PspA zur Orientierung mit angegeben. (c) Flexibilität von H3 und der NTR/CC1. H3 wird dabei durch H2 fixiert, CC1 durch die rückfaltende NTR (*grün*). Weitere Details siehe Text.

Der FBR1 von PspA entsprechen im strukturellen Alignment von ClpB-MD die kurzen Helices H3 und H4, die, zusammen mit dem gegenüberliegenden Teil der Helix 2 (H2), zum Motiv 2 (*motif 2*; S. Lee *et al.*, 2003) zusammengefasst werden. H3 in ClpB (Haslberger *et al.*, 2007) und FBR1 in PspA (diese Arbeit; Osadnik, 2009) gehören zu den stark konservierten Bereichen ihrer jeweiligen Proteine. Für H3 wurde eine direkte Interaktion mit ClpB-MD zur Regulation der ATPase-

Aktivität gezeigt (Haslberger *et al.*, 2007), und die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche legen die gleiche Rolle für FBR1 nahe, sodass auch hier strukturelle wie auch funktionelle Deckungsgleichheit in PspA und ClpB–MD zu bestehen scheint. Dieser Interpretation entsprechend zeigt eine Destabilisierung von Motiv 2 (ClpB) bzw. der FBR1 (PspA) gleiche Auswirkungen auf die ATPase–Regulation: Veränderungen in der hydrophoben Kernregion von Motiv 2 der ClpB–MD führten zur Stimulation der ATPase–Aktivität, und gleiches konnte für die Austausch hydrophober Aminosäuren (I33S und M36A; Abb. 15) sowie Destabilisierung von FBR1 durch Verkürzung von CC2 (Abb. 6) in PspA beobachtet werden.

Eine weitere interessante Entdeckung aus der Analyse von ClpB–Strukturen (S. Lee *et al.*, 2003) war, dass Helix 3 in zwei verschiedenen Konformationen kristallisierte, und in einer der beiden Konformationen teilentfaltet vorlag. Wurde H3 in seiner helikalen Form fixiert (durch Cysteinbrücken mit der gegenüberliegenden H2), konnte kein Kontakt von H3 und der AAA+–Domäne nachgewiesen werden (Haslberger *et al.*, 2007), sodass die Plastizität dieser Region eine zentrale Rolle in der AAA+–Modulation zu spielen scheint. Den Hinweis auf eine ähnliche Plastizität der FBR1 von PspA liefert sowohl die Kristallstruktur von PspA_{1–144}, in der Aminosäuren im Bereich der FBR1 und NTR deutlich höhere B–Werte aufweisen als solche im Rest des Proteins, sowie die atomaren Simulationen, die auf eine deutliche Flexibilität dieser Region in wässriger Lösung hinweisen (Abb. 13). Hier scheint also die Flexibilität dieser AAA+–Interaktionsregion in beiden *Coiled-coil*–Regulatoren vorhanden zu sein. Diese Flexibilität und Teilentfaltung der Region ist für ClpB–MD strukturell wenig problematisch, da H3 N-terminal kovalent mit der stabil gefalteten H2 verknüpft ist (Abb. 55c, grün). In PspA besteht hingegen aufgrund der nicht–kovalenten Bindung zu CC2 jederzeit die Gefahr der Entfaltung, sodass die Rolle der evolutionär konservierten NTR von PspA insbesondere darin liegen könnte, eine ausreichende Stabilität der Region gegen Entfaltung bei gleichzeitiger Flexibilität zu ermöglichen.

Durch Aminosäureaustausche in dieser Region konnten sowohl in PspA, als auch in ClpB Varianten der Proteine hergestellt werden, die die Aktivität der Proteine, insbesondere die Beziehung von ATPase–Aktivität zu physiologischer Wirkung,

deutlich veränderten: Der Austausch von Y503 in *ClpB*-MD führt zu einer erhöhten ATPase-, aber nahezu völligem Verlust der Disaggregations-Aktivität (Oguchi *et al.*, 2012; Y507 in *Hsp104*, Desantis *et al.*, 2014), während die Austausche der Reste R30, E37 sowie einiger anderer in *FBR1* zu erhöhter *Psp*-Produktion *in vivo* führen, dabei aber, wie exemplarisch für E37A gezeigt, die ATPase-Aktivität des *PspA·F*-Komplexes deutlich senken (diese Arbeit; die wichtigen Reste Y503 von *ClpB* und R30 von *PspA* zeigen sich im Strukturalignment an gleicher Stelle und gleich orientiert, Abb. 55b).

Auf Basis der Auswirkungen der Y503- und weiterer *ClpB*-MD-Varianten wurde postuliert, dass die Aktivität von *ClpB* durch die M-Domäne über ein ausbalanciertes *salt bridge network* (Oguchi *et al.*, 2012) reguliert wird. Betrachtet man in der vorliegenden Arbeit in *FBR1* und *FBR2* identifizierten Reste auf der *PspA*-Oberfläche die für die *psp*-Regulation *in vivo* von Bedeutung sind, ist auch hier die Mehrheit geladen (D24, R30, E37, D38, K55, R59 gegen L31). Damit erscheint gleichzeitig die Hypothese, dass *PspA* insbesondere mit einem hydrophoben Bereich an *PspF* interagieren müsse (Zhang *et al.*, 2013; Jovanovic *et al.*, 2014) als sehr unwahrscheinlich. Diese Hypothese wurde bereits durch die Kristallstruktur weitgehend widerlegt, da sich als zentral für die *PspF*-Interaktion angenommene amphipatische Helices von *PspA* als hydrophobe Kernbereiche der Struktur herausstellten (Abb. 12, S.59).

Die nunmehr sowohl für *PspA* als auch *ClpB* beschriebene Entkopplung der ATPase-Aktivität und des physiologischen Effekts erscheint demnach zwar bei isolierter Betrachtung von *PspA·F* verwunderlich, kann aber vor dem Hintergrund ähnlicher Effekte in *ClpB* als typisches Phänomen im Zuge derartiger Austausche eingeordnet werden. Damit sind jetzt für *PspA* und *PspF* (Zhang *et al.*, 2013) Varianten beschrieben worden, die die vermutliche lineare Abhängigkeit der *psp*-Expressionsstärke von der ATPase-Aktivität aufheben und teilweise ins Gegenteil verkehren. Dies deutet auch darauf hin, dass die *PspF*-Aktivität, sowie die Mechanismen der *PspF*-Modulation durch *PspA* komplexer sind als bisher angenommen, jedoch mit ATPase-Assays nicht untersucht werden können. Wie bereits in der Zusammenfassung der ATPase-Assays kurz angedeutet (vgl. S.92), liegt die Schwachstelle

von ATPase-Assays insbesondere in der mangelnden Auflösung zeitlicher und räumlicher Abfolgen, da nur ein durchschnittlicher ATPase-Aktivitätswert pro Monomer erhalten wird. Dabei wird gerade durch neuere Studien deutlich, dass diese (kontrollierte) zeitliche und räumliche Abfolge der ATP-Hydrolyse für die Funktion von AAA+-Proteinen eine zentrale Rolle spielt, und an die jeweilige Funktion der AAA+-ATPase stark angepasst ist: So sorgt die gekoppelte, sequentielle ATP-Hydrolyse im PspF-ähnlichen bEBP NtrC vermutlich für eine spiralförmige Anordnung (*staircase-like arrangement*) der L1- und L2-Loops (mit dem σ^{54} -interagierenden GAFTGA-Motiv) und dadurch für die Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Transkription (Sysoeva *et al.*, 2013). Untersuchungen an PspF deuten darauf hin, dass auch dort eine sequentielle Abfolge der ATP-Hydrolyse zur Transkriptionsaktivierung notwendig ist (Joly und Buck, 2011). Im Falle von ClpX sorgt die koordinierte, quasi simultane ATP-Hydrolyse in zwei bis vier der sechs Protomeren für eine Entfaltung und Translokation von Substraten (Sen *et al.*, 2013), und auch für das in dieser Arbeit als PspA·F-Vorlage dienende ClpB ist eine Koordination der ATPase-Aktivität wahrscheinlich. Hier scheint die DnaK-bindende M-Domäne durch ihre Rotation für eine wellenförmige Aktivierung der Protomere verantwortlich zu sein (Carroni *et al.*, 2014). Vor dem Hintergrund dieser Modelle ist auch im PspA·F-Komplex eine M-Domänen-ähnliche Rolle von PspA in der Koordination der PspF-ATPase möglich. So ließe sich auch der — auf den ersten Blick nur schwer verständliche — Effekt der PspA₁₋₁₄₄^{R59E}-Variante erklären, deren Produktion *in vivo* eine stärkere Inhibition des Psp-Level als die des WT-PspA₁₋₁₄₄ hervorruft, die gleichzeitig aber *in vitro* (bei gleich starker Bindung) im PspA·F-Komplex eine etwa 30 % höhere ATPase-Aktivität zeigt. Wenn die Folge einer R59E-Mutation der Koordinationsverlust der PspF-ATPasen wäre, d.h. ATPasen außerhalb ihrer eigentlichen Hydrolyse-Abfolge aktiver würden, könnte dies die Transkriptionsinitiation *in vivo* stören und damit zu einem geringeren Psp-Level in der Zelle führen.

4.1.2 Die Modulation der PspF-Aktivität – ein Paradigmenwechsel?

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bisher unbeschriebene Eigenschaften des PspA·F-Komplexes beobachtet werden, die die Rolle von PspA in diesem Komplex in einem neuen Licht erscheinen lassen. Besonders hervorzuheben sind hierbei die langzeit-stabile Interaktion von PspA und PspF (Abb. 33), die Fähigkeit von PspA, PspF-Hexamere selbst bei einem substoichiometrischen Verhältnis von 1:6 zu stabilisieren (Abb. 29), und das hohe basale ATPase-Level des PspA·F-Komplexes (Abb. 34). Insbesondere durch die Messungen des K_D und des k_{off} konnte hierbei gezeigt werden, dass dieses basale ATPase-Level *in vitro* weder durch ungesättigten Komplexe, noch durch dissoziierendes PspA zustande kommen kann. Ähnliches zeigte sich auch *in vivo*, wo ein basales Psp-Level —trotz der Überproduktion von PspA₁₋₁₄₄— in jedem Fall zu beobachten war. Hier zeigte die Variante PspA₁₋₁₄₄^{R59E}, die das *psp*-Reporterlevel unter das Detektionslimit senkte, dass die *psp*-Expression prinzipiell vollständig von PspA inhibiert werden könnte, dies aber im natürlichen *psp*-System nicht passiert.¹⁹ Dies bestätigen auch Proteomanalysen von *E. coli* (Calloni *et al.*, 2012; Valgepea *et al.*, 2013), aus denen deutlich wird, dass PspA in deutlichen Mengen in ungestressten Zellen vorliegt, insbesondere auch im Vergleich zu dem u.a. σ^{54} -abhängig produzierten und stress-induzierten IbpB (Kuczyńska-Wisńik *et al.*, 2001), welches in nicht gestressten Zellen kaum detektierbar ist. Interessanterweise konnten von PspB, trotz gleicher Abundanz der mRNA, nur ~ 40 Kopien pro Zelle detektiert werden, statt ~ 1.500 von PspA, PspC konnte nicht detektiert werden (Valgepea *et al.*, 2013).

So muss das basale Psp-Level nicht, wie bisher geschehen, durch geringe Stress-Induktion auch unter normalen Bedingungen gesehen werden (Jovanovic *et al.*, 2014), sondern kann als immanente Eigenschaft des Systems im Gleichgewicht verstanden werden. Wenn man sich die Regulation des *psp*-Systems als negativen Feedback-Loop vor Augen führt, d.h. die hohe Induktion des Systems bei Nicht-

¹⁹Da für die *psp*-Systeme in *E. coli* und *Y. enterocolitica* eine nicht σ^{54} -abhängige, schwache Expression von *pspBC* gezeigt wurde (Brissette *et al.*, 1991; Maxson und Darwin, 2006), kann auch die Notwendigkeit, die putativen Stress-Sensoren PspBC konstitutiv produzieren zu müssen, mit hoher Wahrscheinlichkeit als Induktionsgrund ausgeschlossen werden.

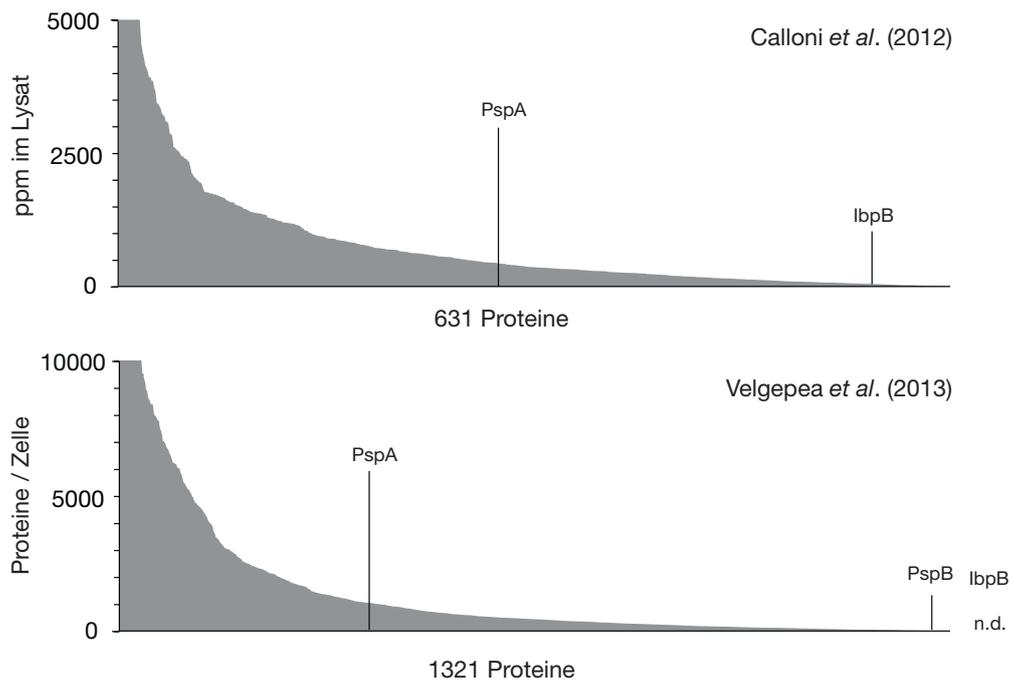


Abbildung 56 PspA wird auch in ungestressten Zellen in deutlichen Mengen produziert. Abundanz zellulärer Proteine, absteigend sortiert. Lage von PspA und Vergleichsproteinen im Abundanzprofil markiert, n.d. – nicht detektierbar. Daten aus Calloni *et al.* (2012) — Gesamtzell-Lysat, (Tabelle S1, 631 Proteine aufgeführt); Valgepea *et al.* (2013) — Proteom von *E. coli* bei exponentiellem Wachstum ($\mu = 0,49 \text{ h}^{-1}$, Tabelle S2, 1321 Proteine detektiert). Zur besseren Darstellung des relevanten Bereichs ist die Abundanz der wenigen, am stärksten vorhandenen Proteine auf der Ordinate beschnitten.

4.1.2 Die Modulation der PspF-Aktivität – ein Paradigmenwechsel?

Sättigung des aktiven PspF-Hexamers *in vivo* mit einbezieht (etwa 100-fach über dem WT-Level in einem $\Delta pspA$ -Stamm), sowie die Stabilität des PspA·F-Komplexes, kann man sogar davon ausgehen, dass der PspA·F-Komplex unter natürlichen Bedingungen nicht nur dauerhaft im „Energiminimum“ des Systems, d.h. vollständig gesättigt in der Zelle vorliegt, sondern das Bestreben des Systems sehr stark ist, diesen Zustand zu erreichen/zum erhalten (dies ist in Abb. 57 skizziert).

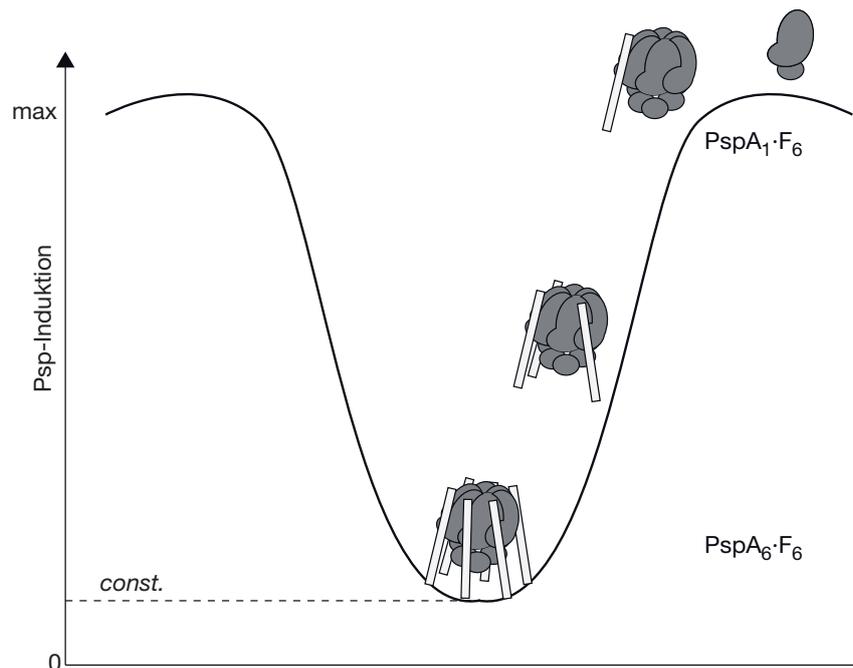


Abbildung 57 Freies PspF ist bestrebt, einen PspA·F-Komplex auszubilden. Schematische Darstellung der „Induktions-Energiezustände“ der PspA-PspF-Interaktion. Sobald ein PspA (weiß) an PspF (dunkelgrau) gebunden hat und das Hexamer stabilisiert, ist das System mit einer hohen *psp*-Induktion bestrebt, den gesättigten PspA·F-Komplex herzustellen, also das „Induktionsminimum“ zu erreichen (welches bei einem konstanten Induktionswert über null liegt). Dieser wird dann nach der (sehr langsamen) Dissoziation von PspA durch erneute PspA-Bindung bzw. starke Induktion der *psp*-Expression unmittelbar wieder hergestellt.

PspA im PspA·F-Komplex — ein Modulator der PspF-Aktivität

Die Tatsache, dass PspA in der Lage ist, PspF sub-stoichiometrisch zu stabilisieren, spricht in Verbindung mit der Erkenntnis, dass der gesättigte PspA·F-Komplex ein basales *psp*-Induktionslevel besitzt, gegen eine alleinige Rolle von PspA als Inhibitor der PspF-abhängigen PspA-Induktion, und insbesondere auch gegen eine signifikante Rolle von freiem PspF in der Regulation des Systems. Demnach

ist PspA auf Basis der hier vorliegenden Daten als stabilisierender Modulator der PspF-abhängigen Regulation zu sehen, analog zur Rolle der M-Domäne in ClpB. Dies gilt insbesondere auch im Kontext „klassischer“ *cis*-agierender Regulator-domänen (N-terminaler *Receiver*-Domänen) anderer EBPs, die jede Komplexbildung des EBP unter nicht-induzierenden Bedingungen verhindern, indem sie inaktive Dimerformen induzieren (z.B. in NtrC und DctD; De Carlo *et al.*, 2006). In NtrC wird diese *Receiver*-Domäne zur Aktivierung des EBPs reversibel phosphoryliert, und die Dephosphorylierung über eine intrinsische Phosphatase-Aktivität sowie eine andere Phosphatase des Regulationssystems (PII-gebundenes NRII) sorgt nach kurzer Aktivität für eine Inhibition und Rückkehr von NtrC in die inaktive Dimerform (Pioszak und Ninfa, 2004).

Eine Modulator-Funktion von PspA würde auch die Ergebnisse von *In-vitro*-Gelshift-Experimenten mit PspA, PspF und dem alternativen Sigma-Faktor σ^{54} erklären, die nicht nur zeigten, dass PspA·F stabil mit der DNA und σ^{54} interagieren kann, sondern darüber hinaus, dass PspA in der Lage ist an einen PspF· σ^{54} -Komplex zu binden, in dem PspF zuvor mittels ADP- AlF_x im Übergangszustand der ATP-Hydrolyse fixiert wurde (Joly *et al.*, 2009). Dieser $\text{PspF}_{\text{ADP-AlF}_x} \cdot \sigma^{54}$ -Komplex wird gemeinhin als transkriptionsaktivierender Zustand von PspF angesehen (Chaney *et al.*, 2001; Burrows *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2014), sodass PspA demnach nicht nur inaktives $\text{PspF} \cdot \sigma^{54}$ binden und damit einen inhibierten „Ready-to-go“-Komplex formen kann (klassisches Modell der *psp*-Inhibition), sondern PspA auch an einen aktiven, transkriptionsinduzierenden Komplex gebunden sein kann. Da auch die ATP-Hydrolyse von PspA nicht vollständig unterbunden wird (wie oben diskutiert), gibt es demnach keine Evidenz dafür, dass PspA überhaupt von PspF dissoziieren muss, damit PspF transkriptionsaktivierend wirken kann.

Hinweise auf interprotomere Regulation von PspF durch PspA

Wie könnte dieser transkriptionsaktivierende PspA·F-Komplex aussehen? Wenn man die atomaren Simulationen, die auf eine stabile Orientierung von PspA auf dem hexameren Ring hinweisen, als Grundlage nimmt, wäre PspA mit FBR1

4.1.2 Die Modulation der PspF-Aktivität – ein Paradigmenwechsel?

senkrecht an PspF orientiert, und im Bereich des als PspA-Bindestelle postulierten W56 (Zhang *et al.*, 2013; Elderkin *et al.*, 2005) auf PspF gebunden. Die Bindung von FBR2 würde auf der Oberfläche von PspF im Bereich der Sensor-II-Helix erfolgen, welche mittels eines Lysin-Restes (K230) an der Bindung von ATP in der Nukleotidbindetasche beteiligt ist (Rappas *et al.*, 2006), und die stark konserviert ist (Ogura und Wilkinson, 2001). Ein PspA würde dabei mit zwei benachbarten Protomeren im hexameren PspF interagieren, d.h. interprotomer regulieren (Abb. 58a). PspA würde in einem derartigen Komplex die Nukleotidbindung nicht verhindern (Abb. 58a, rechts), da es die zwischen zwei Protomeren befindliche Nukleotidbindetasche nicht verdecken würde. Aufgrund der Tatsache, dass PspA lateral am PspF-Ring orientiert ist, könnte in dieser Orientierung zudem auch σ^{54} auf der Oberseite des Hexamers simultan zu PspA an PspF binden, und PspF mit seiner DNA-Bindedomäne auf der Unterseite seine Aktivatorbindestelle im 5'-Bereich des *psp*-Promotors kontaktieren (Abb. 58b).

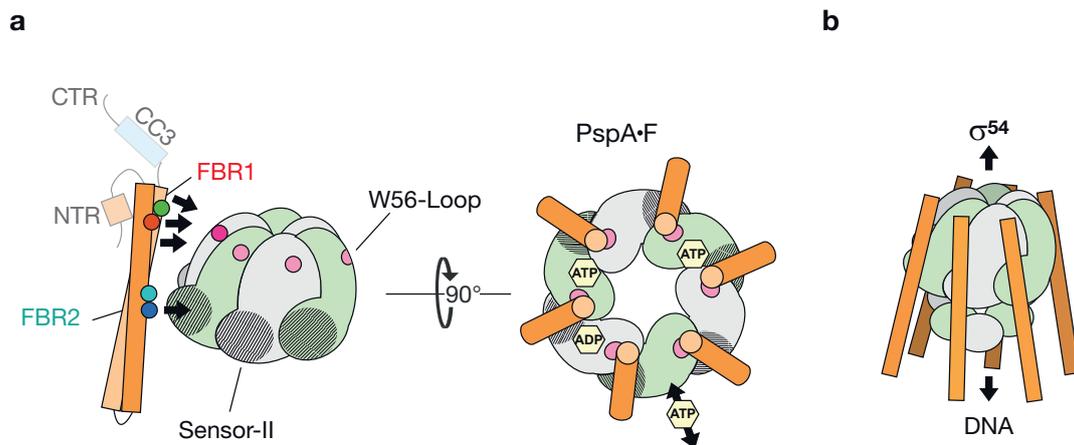


Abbildung 58 PspA bindet wahrscheinlich zwei nebeneinanderliegende PspF-Protomere. (a) Seitenansicht und Aufsicht eines hypothetischen PspA·F-Komplexes nach Vorbild atomarer Simulationen. PspA (orange, NTR und CC3 angedeutet) würde mit FBR1 (rot) in der Region des W56-Loops (pink) auf PspF (grün und grau) binden, und mit FBR2 (blau) auf der Oberfläche von Sensor-II (grau schraffiert) des benachbarten PspF. Dabei wäre die ATP-Bindung nicht behindert (rechts). (b) Im PspA·F-Komplex mit lateral gebundenem PspA könnte PspF sowohl σ^{54} als auch die Aktivator-DNA binden. Die DNA-Bindedomäne ist unterhalb der AAA+-Domäne in etwa maßstabsgetreu angedeutet.

Es sei an dieser Stelle deutlich gemacht, dass eine mögliche stabile Orientierung von PspA auf PspF zwar durch atomistische Simulationen im Rahmen der Simula-

tionsgenauigkeit und der getroffenen Vorannahmen bestimmt werden konnte, diese jedoch in der hier präsentierten Form nur als Andeutung auf mögliche Komplexkonformationen zu verstehen ist. Letztendlich ist die genaue Orientierung von PspA aber für das hier aufgestellte Modell des PspA·F-Komplexes nicht von integraler Wichtigkeit, da das Modell unabhängig von der Simulation Gültigkeit besitzt. Die Komplex-Kristallstruktur wird für die tatsächliche Bestätigung oder Falsifizierung der möglichen Orientierungen notwendig sein.

Eine Bindung des benachbarten AAA+-Protomers ist bereits für die PspA-ähnliche ClpB-MD beschrieben worden (Oguchi *et al.*, 2012), und auch die Wahrscheinlichkeit, dass ein PspA im PspA·F-Komplex zwei PspF-Protomere gleichzeitig bindet, ist ungeachtet der Tatsache, wo sich die genauen Bindestellen befinden, hoch — insbesondere auch deshalb, weil die PspF-Binderegionen auf PspA zu lang zu sein scheinen, um nur als Bindestelle auf der Oberfläche eines PspF zu dienen (wie auch in ClpB-MD). Weiterhin könnte die Bindung zweier PspF-Protomere durch ein PspA den in dieser Arbeit beobachteten Effekt der substoichiometrischen Stabilisierung sehr einfach erklären, da ein von einem PspA gebundenes, dimeres PspF als Nukleationspunkt für die Hexamerisierung dienen könnte, bzw. die Disassemblierung hexameren PspFs durch PspA-Bindung verhindert werden könnte. Als weiteres Indiz für interprotomere Bindung zeigten Zhang *et al.* (2013) mittels künstlicher PspF-Dimere (für die sie WT-PspF sowie kaum PspA-bindende PspF^{W56A}-Monomere fusionierten und so PspF-Hexamere mit einer festgelegten PspF-PspF^{W56A}-Protomer-Abfolge erzeugen konnten), dass PspF-Hexamere, in denen WT-PspF und die W56A-Variante alternierend angeordnet sind, nicht mehr von PspA inhibiert werden können, und keine in Gelfiltrationen nachweisbaren PspA·F-Komplexe gebildet werden. Wenn PspA mit FBR1 und FBR2 ausschließlich intraprotomer (d.h. nur auf einem Protomer) und nicht interprotomer (auf zwei Protomeren) binden und regulieren würde, könnte für solche PspF-PspF^{W56A}-Dimere zumindest die PspA-Bindung an jedes zweite Protomer erwartet werden. Wenn PspA aber — wie hier postuliert — auf zwei benachbarte Protomere bindet, könnte die Störung der Bindung an jedes zweite Protomer bereits dafür sorgen, dass die PspA-PspF-Interaktion derart geschwächt wird, dass keine stabile Bin-

dung von PspA mehr erfolgen kann. Insgesamt sprechen also mehrere Indizien für die interprotomere Bindung von PspA im PspA·F-Komplex, unabhängig von der simulierten Orientierung von PspA an PspF.

Eigene Untersuchungen mit PspF^{W56A} und insbesondere der Interaktion von PspF^{W56A} mit PspA-Varianten zeigten, dass diese PspF^{W56A}-Variante trotz schlechter Bindung von PspA ($K_D > 100 \mu\text{M}$) *in vivo* immer noch von der PspA^{E37A}₁₋₁₄₄-Variante aktiviert werden konnte, sodass mit diesem Ergebnis eine weitere Bestätigung dafür erhalten werden konnte, dass der aktivierende Effekt, den PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ im Vergleich zu WT-PspA₁₋₁₄₄ auf die *psp*-Regulation hat, durch eine Veränderung der Funktion der FBR1 von PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ im PspA·F-Komplex zustande kommen muss.²⁰ Hier ist zu bemerken, dass die Aminosäuren E37 (PspA) und W56 (PspF) in den Simulationen zwar keine direkten Interaktionspartner waren, aber doch in mittelbarer Nachbarschaft lagen (6 Å), sodass möglicherweise kein starker Effekt von E37A in der W56A-PspF-Variante *in vivo* zu erwarten gewesen wäre, wenn durch W56A in PspF der gemeinsame Interaktionsbereich beider Reste bereits stark gestört worden wäre (worauf die AUC-Messungen hindeuten). Auch hier wird letztendlich die Kristallstruktur des Komplexes benötigt, um weitere Schlussfolgerungen zum Effekt von E37A anstellen zu können, seine Rolle als Aktivator ist jedoch deutlich gezeigt.

Signalintegration und Transkriptionsregulation durch einen aktiven PspA·F-Komplex

Wie könnte nun die *psp*-Regulation und -Induktion durch einen stabilen PspA·F-Komplex aussehen? Für die Disaggregase ClpB, die aufgrund der PspA-ähnlichen Regulationsdomäne im Rahmen dieser Arbeit als ideelle Vorlage für den PspA·F-Komplex genommen wurde, konnte eine Induktion der Disaggregase-Aktivität durch Bindung von DnaK an die M-Domäne nachgewiesen (Seyffer *et al.*, 2012) und weiterhin gezeigt werden, dass diese DnaK-MD-Interaktion mit einer Rotation der M-Domäne einhergeht (Carroni *et al.*, 2014). Auf ähnliche Weise könnte auch

²⁰Wie bereits im Ergebnisteil angedeutet (S. 94), hätte sich das Ausbleiben einer Regulation von PspF^{W56A} durch PspA^{E37A}₁₋₁₄₄ dadurch gezeigt, dass das *psp*-Reporterlevel auf Höhe der Leervektorkontrolle geblieben wäre.

eine PspA-abhängige Induktion des *psp*-Systems stattfinden. So könnten durch partielles Dissoziieren von PspA (d.h. z.B. Lösen der FBR1-PspF-Interaktion) PspF-Protomere aktiviert werden (Abb. 59a; aktives PspF in rot), ohne dass PspA vollständig vom Komplex dissoziieren müsste. Hier könnte eine Signalintegration darüber passieren, dass ein gewisser Grenzwert an gleichzeitig aktivierbaren PspF-Protomeren erreicht sein muss, sodass die gerichtete ATPase-Aktivität des Komplexes stattfinden kann. Der PspA·F-Komplex könnte dabei frei in der Zelle diffundieren (und, wie teilweise postuliert, mit PspB·C interagieren, Mehta *et al.*, 2013) bzw. am Promotor verbleiben und dort durch (bisher unbekannt) Signale über PspA aktiviert werden (Abb. 59b).

Diese, im Falle der Induktion teilweise aufgehobene interprotomere Interaktion von PspA könnte auch erklären, wie PspA die PspF-ATPase in gebundenem Zustand inhibiert: Mittels einer asymmetrischen Kristallstruktur des EBP NtrC konnten Hinweise darauf erhalten werden, dass sich für die ATP-abhängige σ^{54} -Aktivierung Lücken zwischen benachbarten EBP-Protomeren bilden müssen, die nukleotidabhängig induziert werden und evtl. den Zustand des Rings kurz nach der ATP-Hydrolyse in einer der Untereinheiten widerspiegeln (Sysoeva *et al.*, 2013). Wenn PspA zwei Protomere von PspF im Hexamer binden könnte, würde diese Interaktion die benachbarten PspF-Protomere aneinander fixieren, sodass keine Lückenbildung zwischen den Protomeren stattfinden würde, und PspF über diesen Mechanismus somit von PspA inhibiert werden könnte.

Die *Tip*-Region wirkt eventuell indirekt auf die *psp*-Regulation

Eine interessante Beobachtung konnte im Rahmen dieser Arbeit bei dem Austausch einiger konservierter Aminosäuren in der *Tip*-Region gemacht werden, deren nur marginaler Effekt auf die PspF-Inhibition sich mit Austauschen in der FBR1 zu multiplizieren schien, wodurch auf unterschiedliche Funktionen beider Austausche in der Regulation geschlossen werden kann. In ClpB konnte für die entsprechende Region (Loop zwischen H1 und H2) sowohl eine Interaktion mit dem benachbarten AAA+-Protomer (Oguchi *et al.*, 2012), als auch der Spitze der benachbarten M-Domäne (dort der Loop zwischen H1 und H2; Carroni *et al.*, 2014) gezeigt werden.

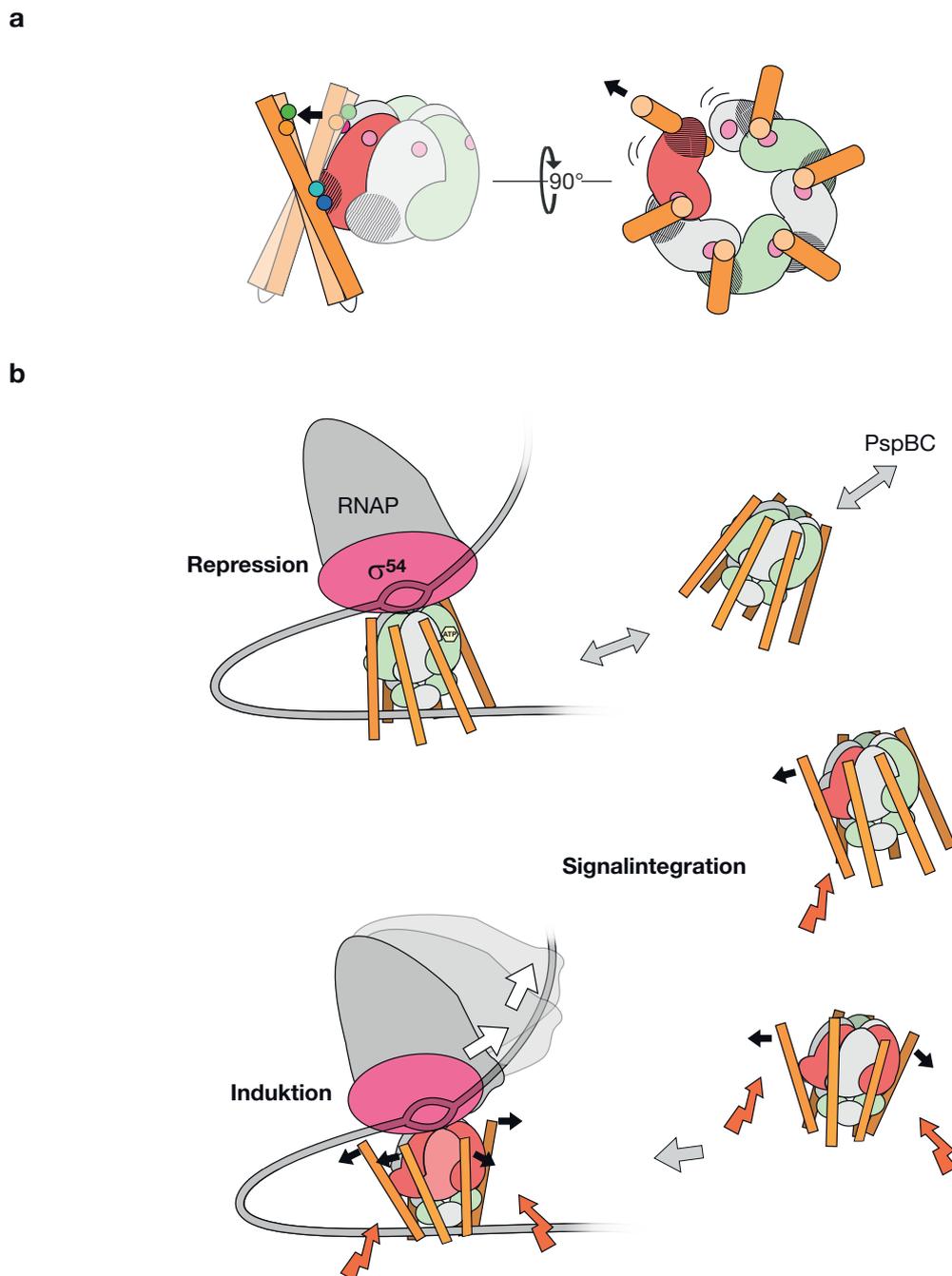


Abbildung 59 Die Aktivierung von PspF und eine mögliche Signalintegration durch den PspA·F-Komplex. (a) Die Aktivierung von PspF könnte durch partielles Lösen der PspA-PspF-Interaktion realisiert werden (aktives PspF in *rot*). Hierbei könnte sich eine während des ATP-Hydrolysezyklus eventuell notwendige Lücke zwischen zwei PspF-Protomeren bilden (rechts), sobald PspA eines der beiden gebundenen Protomere entlässt. (b) Mögliche Signalintegration durch das gebundene PspA im PspA·F-Komplex. Der PspA·F-Komplex kann in inhibierter Form an σ^{54} und die DNA binden, bzw. frei durch die Zelle diffundieren (eventuell PspB·C kontaktierend). Erst wenn ein Signal-Grenzwert überschritten ist (Blitze), sind genügend PspF-Moleküle im PspA·F-Komplex aktiv, um die Transkription zu induzieren.

Die Interaktion der M-Domänen untereinander in einer planaren *Head-to-tail*-Anordnung um den AAA+-Ring repräsentiert hierbei die inaktive Form von ClpB. Die Aktivierung erfolgt über Bindung von DnaK und die damit einhergehende, oben bereits beschriebene Rotation der M-Domäne. Für die *Tip*-Region von PspA wäre eine ähnliche Funktion in einem putativen, inaktiven PspA·F-Komplex denkbar, allerdings könnte diese Region auch, wie das in Abbildung 59 gezeigte Modell andeutet, mit Elementen auf der DNA bzw. der DNA-Bindedomäne von PspA interagieren, wodurch der regulatorische Effekt der *Tip*-Region nicht zwangsläufig mit der direkten Modulation der ATPase-Aktivität von PspF zusammenhängen muss.

4.1.3 Ein aktiver PspA·F-Komplex im Kontext des aktuellen Psp-Modells

In den vorangegangenen Abschnitten wurde das Modell eines Modulator-PspAs aus den eigenen *In-vitro*-Untersuchen heraus etabliert, und dessen Gültigkeit sowohl *in vivo* als auch im Kontext publizierter *In-vitro*-Studien zur PspA·PspF· σ^{54} -Interaktion demonstriert. Dieses Modell steht jedoch in einigen Punkten im Widerspruch mit dem aktuell diskutierten Modell der *psp*-Regulation. Im Folgenden werden die beiden Modelle gegenübergestellt und Erklärungsansätze für ihre unterschiedliche Interpretation der *psp*-Regulation gegeben.

Modulation vs. Assoziation-Dissoziation — Zwei Zustände der *psp*-Regulation

Das aktuell diskutierte Modell zum *psp*-Regulationsmechanismus besagt zusammengefasst, dass die Induktion des *psp*-Systems über die Dissoziation von PspA von PspF geschieht. Die Dissoziation erfolgt durch ein PspBC-abhängiges Signal (aufgrund von Membranstress), welches zur Bindung von PspA und damit der Ausbildung eines PspABC-Komplexes führt. Entweder durch Übergabe von PspA oder durch einfache Dissoziation wird dadurch PspF frei, welches im Folgenden zu einer Induktion des *psp*-Systems führt (siehe Einleitung; Yamaguchi *et al.*,

4.1.3 Ein aktiver PspA·F-Komplex im Kontext des aktuellen Psp-Modells

2010; Yamaguchi *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Jovanovic *et al.*, 2014). Die Dauer der Induktion und deren Stärke hängen dabei von dem PspA-Sättigungsgrad des hexameren PspF ab. Ein Vergleich dieser hier relevanten Eigenschaften des Modells der „Assoziation-Dissoziation“ mit dem neu aufgestellten „Modulator“-Modell ist in Abbildung 60 dargestellt und wird im weiteren Verlauf detaillierter erläutert.

Hochinduktoren als Goldstandard der *psp*-Regulation

Das Assoziations-Dissoziations-Modell der PspA-abhängigen PspF-Regulation wurde innerhalb der letzten Jahre durch einige Studien bestätigt, in denen mittels Co-Elutionsstudien eine klare Verschiebung von PspA aus PspA·F-Komplexen in PspA·B·C-Komplexe bei Stress-Induktion gezeigt werden konnte. Ein Großteil der *in vivo* gewonnenen Daten zur stressabhängigen Induktion des *psp*-Systems ist dabei mit einer begrenzten Zahl von stark *psp*-induzierenden Proteinen erhalten worden, die im Folgenden als „Hochinduktoren“ bezeichnet werden. Zu ihnen gehört das Phagensekretin pIV, dessen stark induzierender Einfluss auf das *psp*-System in *E. coli* letztlich zur Entdeckung und Namensgebung von PspA geführt hat (Brissette *et al.*, 1990), sowie einige in einem Screening auf (Hoch-)Induktoren des *psp*-Systems identifizierte Proteine aus *Yersinia enterocolitica* (Maxson und Darwin, 2004). All diesen Proteinen ist gemein, dass sie einen stark induzierenden Effekt auf das *psp*-System zeigen, der den regulativen Einfluss anderer Induktoren des Systems (osmotischer Stress, CCCP) in den meisten Fällen weit übersteigt (Tab.10, fett). Die Stärke aller Induktionen, die nicht durch Hochinduzierer ausgelöst wurde, konnte durch in dieser Arbeit hergestellte Varianten von PspA₁₋₁₄₄ erreicht werden (Tab.10, kursiv). Die artifizielle Aktivierung des PspA·F-Komplexes führt daher zu einer mit Stressbedingungen vergleichbaren Induktion. Da auch die aktivierenden PspA-Varianten weiterhin stark an PspF binden, kann geschlussfolgert werden, dass das *in vivo* bei Stress beobachtete Induktionsniveau des *psp*-Systems mit gebundenem PspA erreicht werden kann, wenn ein Signal in gebundenem PspA eine „aktivierende“ Konformation/Orientierung induziert.

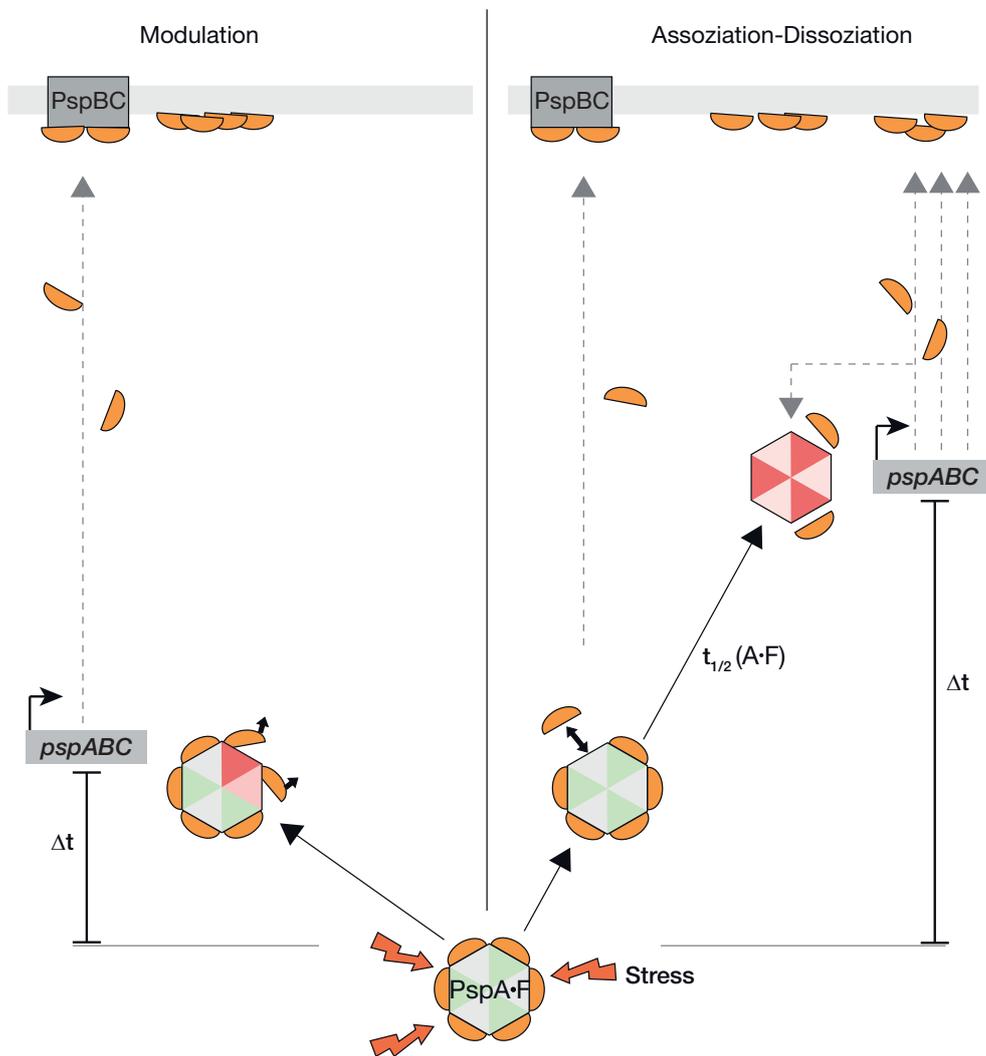


Abbildung 60 Vergleich der beiden postulierten *psp*-Regulationsmechanismen. (links) *psp*-Induktion nach in diesem Abschnitt postulierten Modulator-Modell, (rechts) Induktion nach dem in der Literatur diskutierten Assoziation-Dissoziation-Modell. Δt - Reaktionszeit des Komplexes bis zur *psp*-Induktion (qualitative Darstellung). Beide Modelle gehen von einem gesättigten PspA·F-Komplex aus (unten). Nach Detektion eines Stresssignals wird im Falle des Modulators die *psp*-Expression durch Konformationsänderung im Komplex induziert (links, kurze Δt), was zu PspA-Produktion führt (gestrichelte Pfeile). Im Assoziations-Dissoziations-Modell muss PspA von PspF abdissoziieren (rechts, dieser Vorgang ist von der Halbwertszeit $t_{1/2}$ des Komplexes abhängig), daher ist die Reaktionszeit Δt vergleichsweise hoch. Neu produziertes PspA würde dann an die Membran binden und ebenfalls das aktivierte PspF zur erneuten Inhibition absättigen.

4.1.3 Ein aktiver PspA·F-Komplex im Kontext des aktuellen Psp-Modells

Tabelle 10 Vergleich von Induktionsbedingungen des *psp*-Systems

Bedingung	Induktion	Quelle
<i>R59E</i>	0,3	diese Arbeit
Osmotischer Schock	2,4–3,3	Weber <i>et al.</i> , 2006
<i>K27A</i>	2,5	diese Arbeit
T3SS (Virulenzplasmid)	2,6	Darwin und V. L. Miller, 2001
10 % EtOH	3,6	Jovanovic <i>et al.</i> , 2006
<i>K55E</i>	4	diese Arbeit
40 µM CCCP	4	Engl <i>et al.</i> , 2011
50 °C	4,4	Jovanovic <i>et al.</i> , 2006
pH 9 über Nacht	10	Becker <i>et al.</i> , 2005
Bakteriophagen-Infektion (PRD1)	11,2	Poranen <i>et al.</i> , 2006
<i>E37A</i>	23	diese Arbeit
AmpE	30	Maxson und Darwin, 2004
MP196 (Hexapeptid)	36	Fränzel <i>et al.</i> , 2012
pIV	100	Lloyd <i>et al.</i> , 2004 ⁺
YsaC	115	Maxson und Darwin, 2004
Yts1D	121	Maxson und Darwin, 2004

Qualitative Übersicht über das Induktionsniveau des *psp*-Systems unter verschiedenen Bedingungen (x-fach, linear). Hierbei sind Daten aus verschiedenen γ -Proteobacteria zusammengefasst. In Fettdruck sind „Hochinduzierer“ hervorgehoben, in dieser Arbeit erzeugte Varianten von PspA_{1–144} kursiv gedruckt; mit ihnen lässt sich ein Großteil der Induktionsbedingungen simulieren. ⁺ Original-*supplement* der Publikation nicht mehr abrufbar; zitiert in Jovanovic *et al.* (2014).

Neben ihrer Fähigkeit, das *psp*-System stark zu induzieren, stimmen die Hochinduzierer weiterhin in der Eigenschaft überein, dass sie keine natürlicherweise auftretenden Induktoren des Systems sind, sondern bei isolierter Überproduktion zu Hochinduktoren werden (mit Ausnahme des pIV-Sekretins). Insbesondere die in Studien verwendeten Sekretine von *Y. enterocolitica* besitzen natürlicherweise Faltungs- bzw. Insertionsshelfer, die die korrekte Lokalisation des Proteins auch im Falle hoher Produktion sicherstellen (z.B. das Lipoprotein YscW im Falle des Sekretins YscC), wodurch es unter ihren natürlichen Produktionsbedingungen zu keiner massiven Induktion des *psp*-Systems kommt ($\sim 2,6$ -fach; Darwin und V. L. Miller, 2001).

Diese Hochinduktor-Bedingungen könnten damit im *psp*-System einen anderen Regulationsmechanismus auslösen, als jenen, der unter physiologisch möglicherweise relevanteren, niedrigen Induktionsbedingungen vorherrscht. Im Rahmen der für die ATPase-Inhibitionstudien in dieser Arbeit verwendeten Begrifflichkeiten könnte durch Hochinduzierer die Regulation des PspA·F-Komplexes also von „Basal-Level“-Regulation auf „K_D-abhängige“ Regulation verschoben werden (vgl. Abb. 34, S.91). Wie in Abbildung 60 angedeutet, müssten die Reaktionszeiten auf Stressoren nach dem „Assoziations-Dissoziations“-Modell im Vergleich zum „Modulator“-Modell hoch sein (Δt), da sie von der Halbwertszeit des PspA·F-Komplexes abhängen (~ 43 Minuten *in vitro*), und nicht bloße Konformationsänderungen des Komplexes darstellen. Tatsächlich scheint die Hypothese, dass die durch Hochinduzierer ausgelöste *psp*-Induktion durch langsame PspA-Dissoziation hervorgerufen wird, bestätigt zu werden, da die Psp-Level 30 Minuten (Jovanovic *et al.*, 1996) bzw. eine Stunde (Spagnuolo *et al.*, 2010) nach Beginn der Sekretinproduktion kaum ansteigen, nach vier Stunden aber deutlich erhöht sind (Horstman und Darwin, 2012).²¹ Dementsprechend ist in Betracht zu ziehen, dass die im Falle der Hochinduzierer beobachtete starke Regulation des *psp*-Systems den Grenzfall (und nicht den Normalfall) der *psp*-Regulation darstellen, also den Zustand, in dem der PspA·F-Komplex sich nicht mehr im Gleichgewicht befindet.

²¹Nur in einem Fall konnte eine schnellere Reaktion auf Sekretine nachgewiesen werden (Brissette *et al.*, 1990), der Grund hierfür ist unklar.

4.2 PspA_{160–222}: Welche physiologische Relevanz haben PspA-Oligomere?

Di- oder Trimere sind die minimale Oligomerstruktur von PspA/IM30-Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der Charakterisierung von PspA_{1–144} und des PspA·F-Komplexes auch grundlegende Untersuchungen mit dem C-terminalen, nicht kristallisierten Bereich von PspA durchgeführt. Hierbei zeigten *In-silico*-Vorhersagen, dass es sich bei dem Bereich der Aminosäuren 160-222 vermutlich um eine eigenständige Domäne von PspA handelt, in der sich mit CC3 eine weitere *Coiled-coil*-Helix befindet. Es lag daher die Vermutung nahe, dass der C-terminale Bereich von PspA die Oligomerisierungsdomäne des Proteins darstellt, da PspA in der Lage ist, größere Oligomere zu bilden (Hankamer *et al.*, 2004; Standar *et al.*, 2008). Diese putative Oligomerisierungsdomäne zeigte sich in AUC-Sedimentationsgleichgewichtstudien als Monomer, und nur in einer kürzeren Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung konnte sie teilweise in oligomerer Form detektiert werden (Abb. 47, S.111). In Gelfiltrationsstudien gelang der Nachweis einer oligomeren Konformation, jedoch erst in Mischversuchen mit markiertem und unmarkiertem PspA_{160–222}. Insgesamt erwies sich dieser Bereich als experimentell schwer zugänglich, da selbst eine *In-vitro*-Modifikation wie die N-terminale Atto488-Markierung zu einem Verlust der Oligomerisierung führte, was scheinbar auch für das ebenfalls in der AUC untersuchte, C-terminal um einen Tryptophan-Linker erweiterte Fragment der Fall war, sodass das Oligomer dieser Domäne von PspA in isolierter Form *in vitro* möglicherweise instabil ist.

Da PspA_{1–144} in Lösung ausschließlich als Monomer vorliegt und damit nicht zur Oligomerisierung des Proteins beitragen sollte, ist das minimale Oligomer von PspA vermutlich ein „Bündel“ von drei (oder zwei, für diese Unterscheidung waren die Gelfiltrations- und Sedimentationsdaten zu ungenau) am C-Terminus miteinander verbundenen PspF-Bindedomänen (Abb. 61 zeigt mehrere Möglichkeiten der Orientierung – *a, b* Trimere, *c* Dimer). Da diese dritte *Coiled-coil*-Helix in

vielen Psp/IM30-Proteinen konserviert ist (insbesondere auch das bis auf wenige Abweichungen konservierte putative Trimerisierungsmotiv; Kammerer *et al.*, 2005), scheint neben der Architektur von PspA₁₋₁₄₄ auch diese Di-/Trimerisierung evolutionär konserviert zu sein. Die Proteine der PspA/IM30-Familie ähneln damit strukturell dem periplasmatischen Chaperon Skp (Walton und Sousa, 2004) aus *E. coli*, für das die Bildung eines quasi identischen Komplexes in der Kristallstruktur gezeigt wurde, sowie dem eukaryotischen und archaealen Prefoldin (Siegert *et al.*, 2000).

Darüber hinaus konnte für das PspA-Homolog YjfJ die Bindung eines konservierten, dimeren Proteins (Yjfl) an den C-terminalen Bereich gezeigt werden (Abb. 61d), dessen Bindung eine noch unbekannte Rolle spielt. Da die Interaktion von Yjfl und YjfJ aufgrund der genomischen Nachbarschaft von *yjfI* und *yjfJ* u.a. in *E. coli* und *P. aeruginosa* konserviert ist (unveröffentlichte Daten; vgl. Klaus, 2013; Macé *et al.*, 2008), scheint diese Komplexbildung von zentraler Bedeutung zu sein. Ähnliche, lösliche Interaktionspartner sind für andere PspA-Proteine bisher nicht beschrieben worden. Hier müssen zukünftige Studien zeigen, ob Yjfl an der Oligomerisierung von YjfJ unterstützend beteiligt ist (denn nur in YjfJ-ähnlichen Proteinen ist in diesem Bereich das „Trimermotiv“ leicht schwächer konserviert), und die Proteine möglicherweise in einem stabilen Yjfl·J-Komplex vorliegen, oder ob die Interaktion einen anderen Grund hat. Erste weiterführende Versuche deuten auf Interaktionen von Yjfl mit weiteren zellulären Proteinen von *E. coli* hin (Terhorst, 2014), sodass auch die Rolle eines Adapterproteins möglich scheint.

Eine interessante Frage ist nun, ob und wie aus diesen minimalen Einheiten größere oligomere Strukturen entstehen können. Hierzu konnte gezeigt werden, dass sowohl PspA₁₋₁₄₄ als auch PspA₁₆₀₋₂₂₂ vollständig löslich sind, und somit beide Domänen von PspA über keine Determinanten verfügen, die eine stabile Interaktion mit der Membran ermöglichen. Daher kann auch die von Jovanovic *et al.* (2014) postulierte Funktion der hypothetischen amphipatischen Helix *ahA* (entspricht etwa der rückfaltenden NTR) als Membranbindeterminante nahezu ausgeschlossen werden, denn PspA₁₋₁₄₄ enthält die NTR und ist löslich. Auch eine konditionale

4.1.3 Ein aktiver PspA·F-Komplex im Kontext des aktuellen Psp-Modells

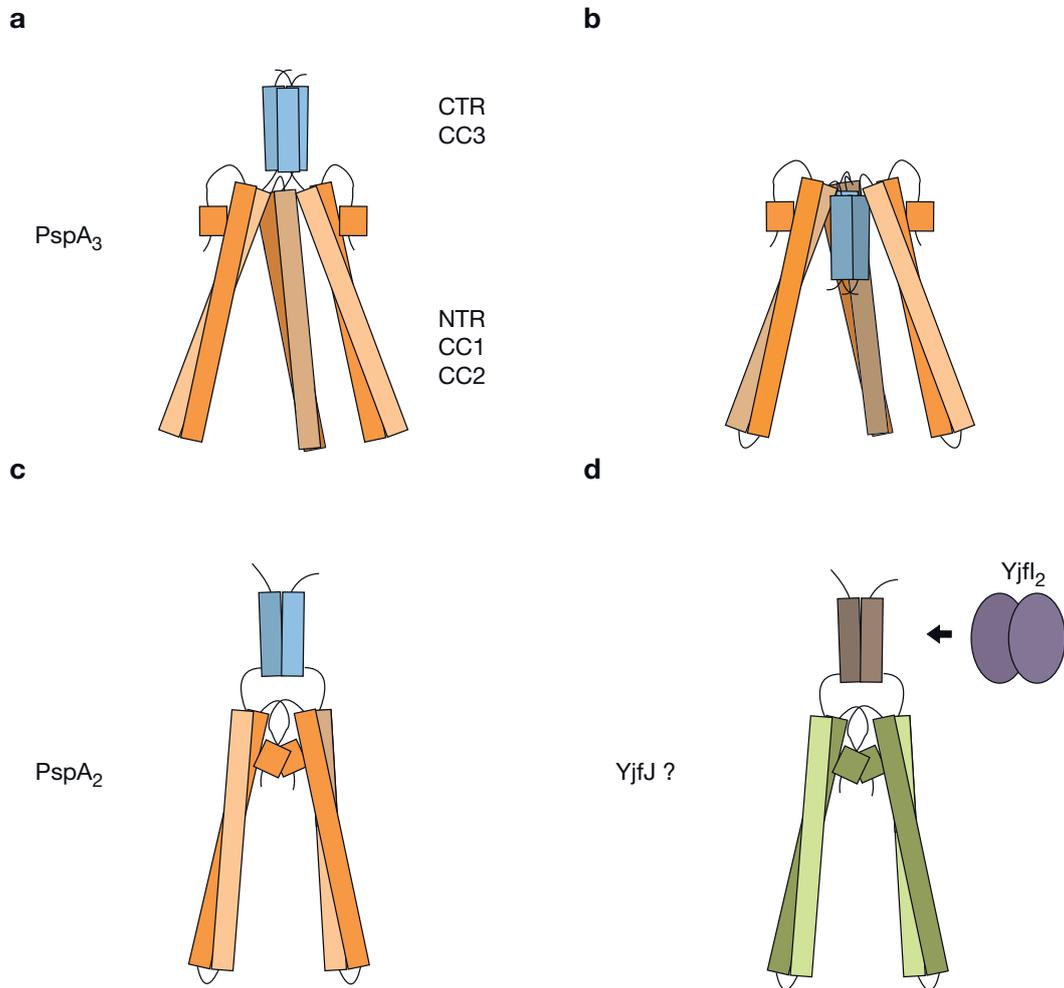


Abbildung 61 Mögliche Formen des minimalen PspA/IM30-Oligomers. (a, b) Trimerer „Bündel“ von PspA mit unterschiedlichen Ausrichtungen der Domänen zueinander. (c) Dimere Konformation. *Blau* – C-terminale Domäne (PspA_{160–222}), *orange* – PspF-Bindedomäne (PspA_{1–144}). Die Unterscheidung in Di- oder Trimer war aufgrund der erhaltenen Daten (Gelfiltration, AUC) nicht möglich. PspA_{1–144} ist ein lösliches Monomer und interagiert wahrscheinlich im Komplex nicht mit anderen PspA_{1–144}. (d) Mögliche Oligomerstruktur des PspA-Homologs YjfJ aus *E. coli*, analog zur PspA-Struktur. Für YjfJ ist das homodimere Yjfl (*lila*) als Interaktionspartner im C-terminalen Bereich von YjfJ (*braun*) identifiziert worden. Der Zweck der Interaktion ist bislang unbekannt.

Membranbindung der NTR (also erst bei „Aktivierung“ des *psp*-Systems) ist sehr unwahrscheinlich: Da die Überproduktion von PspA₁₋₂₂₂ ausreicht, um dessen Membraninteraktion zu induzieren (Yamaguchi *et al.*, 2010), sollte der gleiche Effekt auch eine konditionale Membranbindeterminante in einem Fragment dazu veranlassen, an die Membran zu binden. PspA₁₋₁₄₄ kann jedoch (wie auch die C-terminalen Fragmente) so stark wie PspA₁₋₂₂₂ überproduziert werden, und ist dennoch vollständig löslich. Dennoch könnte eine Membraninteraktion von PspA zustande kommen, wenn die in Nachbarschaft zueinander liegenden NTR und CC3/CTR (vgl. Abb. 61) miteinander interagieren, was durch die isolierte Untersuchung der Fragmente PspA₁₋₁₄₄ und PspA₁₆₀₋₂₂₂ ausgeschlossen war. Einen Hinweis auf eine solche mögliche synergistische Funktion von NTR und CC3/CTR in der Oligomerisierung gibt die Tatsache, dass ein PspA-Fragment ohne NTR (PspA_{Δ2-19}; Jovanovic *et al.*, 2014) löslich vorliegt, also die NTR für die Membranbindung notwendig zu sein scheint, aber nur in Verbindung mit CC3/CTR. Weitere Evidenz ergibt sich aus dem Effekt von Einzelaustauschen in der NTR und CTR von PspA (PspA^{N14D} und PspA^{L200S}, Yamaguchi *et al.*, 2010), die jeweils sowohl die Membraninteraktion, als auch die Induktion des *psp*-Systems unter Stress verhindern. Hier könnte durch jene Austausche die Interaktion der beiden Domänen NTR und CTR unterbunden werden. In Gelfiltrationen zeigte sich keine stabile Interaktion von PspA₁₋₁₄₄ und PspA₁₆₀₋₂₂₂ (Abb. 46, S.110), die NTR und CC3/CTR enthielten (allerdings auf getrennten Fragmenten), sodass scheinbar nicht nur diese beiden Abschnitte des Proteins, sondern auch ihre kovalente Interaktion notwendig ist, um größere Oligomere zu induzieren.

Sind große *in vitro* beobachtete PspA-Oligomere Aggregationsartefakte?

Hiermit stellt sich mit der strukturellen Aufklärung von PspA₁₋₁₄₄ und der Charakterisierung von PspA₁₆₀₋₂₂₂ auch die Frage der physiologischen Relevanz solcher großer PspA-Oligomere. Jene großen Komplexe zeigten sich als netzwerkartige Strukturen von heterogener Größe, die durch CHAPS-Behandlung kollabierten (Standar *et al.*, 2008; Osadnik, 2009). Nicht mit Detergenz behandelte Oligomere

4.1.3 Ein aktiver PspA·F-Komplex im Kontext des aktuellen Psp-Modells

waren etwa 30-fach ineffektiver in der PspF-Inhibition (Dworkin *et al.*, 2000) als in Anwesenheit von CHAPS gereinigte und gelagerte (Elderkin *et al.*, 2005), was für einen teilweisen Funktionsverlust von PspA in diesen Oligomeren spricht (man kann hier damit argumentieren, dass dieser Verlust der PspF-Bindung physiologisch relevant ist, um das *psp*-System zu induzieren). PspA-Oligomere sind von heterogener Größe, die von Hankamer *et al.* (2004) auf Basis von SEC-Größenbestimmung postulierten 36-mere (1023 kDa) eluierten in späteren Untersuchungen auf Höhe eines 90-mers (Joly *et al.*, 2009) oder 72-mers (~ 2000 kDa; Jovanovic *et al.*, 2014), was durch das in der vorliegenden Arbeit gezeigte aberrante Laufverhalten von PspA zustande kommt, und jede Größenbestimmung der Oligomere fraglich erscheinen lässt. Aseeva *et al.* (2004) konnten PspA-identische, heterogene Netzwerkstrukturen für das plastidäre PspA-Homolog VIPP1 nachweisen, hier jedoch sogar nach Rückfaltung aus *inclusion bodies*, wodurch angenommen werden kann, dass PspA und VIPP1 diese oligomeren Strukturen spontan und ohne den Einfluss anderer zelluläre Komponenten ausbilden können.

In diesem Kontext der spontanen Strukturbildung ist auch die Eigenschaft von PspA zu erklären, bei starker Expression von *pspA* — ob ektopisch von einem Plasmid aus oder durch Hochinduktoren wie Sekretine vom natürlichen Locus aus — spontan mit der Membran zu interagieren (Yamaguchi *et al.*, 2010). Diese Eigenschaft wird mit der membran-stabilisierenden Rolle von PspA in membran-gebundenen Oligomeren erklärt (also einer PspBC-unabhängigen Möglichkeit der Membranstabilisation unter Stressbedingungen). Eine Membranstabilisierung gilt als kanonische Funktion dieses Proteins neben der PspF-Regulation (Jovanovic *et al.*, 2014; Mehta *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2013), jedoch gibt es keine Vorstellung darüber, mit welchen Bereichen PspA dabei an die Membran bindet, oder wie PspA diese Funktion molekular realisieren könnte.²² Die Kristallstruktur von PspA₁₋₁₄₄ liefert ebenfalls keine bestätigenden Hinweise für eine mögliche Phospholipidbindung, da in jener keine augenfälligen Membrankontaktflächen erkennbar waren (positiv geladene oder hydrophobe *patches*; unveröffentlichte

²²Eine Vesikel-stabilisierende Funktion von PspA *in vitro* ist bisher einmalig von Kobayashi *et al.* (2007) beschrieben worden, jedoch ohne weitere mechanistische Erläuterung.

Daten). Demnach können weder die Bildung großer Oligomere, noch die dedizierte Membraninteraktion von PspA durch publizierte Studien und die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen strukturellen Daten erklärt werden.

Es besteht bei großen (Homo-)Oligomerstrukturen stets die Wahrscheinlichkeit, dass sie als Aggregate durch Überproduktion und Instabilität von Proteinen entstehen. Dabei können die aggregatbildenden Proteine noch zum Großteil gefaltet und aktiv in diesen Strukturen vorliegen (García-Fruitós *et al.*, 2005), sodass die Funktionalität von Proteinen in Oligomerstrukturen kein Ausschlusskriterium für Aggregatbildung ist. Tatsächlich konnte die Bildung teilstrukturierter *active inclusion bodies* durch C-terminale Fusion einer kurzen amphipatischen Helix an ein Zielprotein induziert werden, wobei diese Strukturen je nach Ladungsverteilung auf der Helix cytoplasmatisch oder membranassoziiert vorlagen (Lin *et al.*, 2013). Im Falle, dass die PspA-Oligomere aus einer Aggregatbildung entstehen, würde man insbesondere eine Interaktion der Oligomere mit Chaperonen erwarten bzw. eine Hochregulation der σ^{32} -abhängigen Hitzeschockantwort (Lesley *et al.*, 2002). Beides wurde gezeigt, so gibt es DnaK/DnaJ-abhängigen Abbau von VIPP1-Strukturen in *Chlamydomonas reinhardtii* (Liu *et al.*, 2005), sowie eine Interaktion von VIPP1 mit der plastidären Disaggregase ClpB2 (Hamad, 2008). Bereits in den ersten Veröffentlichungen zum *psp*-System in *E. coli* wurde eine Verlängerung der *psp*-Induktion in σ^{32} -Deletionsmutanten beschrieben (Weiner *et al.*, 1991), was mit einer Rolle der Hitzeschock-Proteine in der Disaggregation von regulativ inaktiven PspA-Oligomeren/Aggregaten zu erklären wäre. Komplementär dazu führte die Überproduktion von PspA (*psp*-Expression von einem Plasmid aus) insbesondere zur Hochregulation von *clpB* (5-fach, und damit auf Platz 6 der durch PspA hochregulierten Gene) und anderer Chaperon-/ oder Proteasegene (*dnaK*, *lon*, *dnaJ*, alle ~ 3 -fach; Jovanovic *et al.*, 2006). Da die oben beschriebenen Hochinduzierer das *psp*-System ohne weiteres auf etwa das 20–100-fache des basalen Psp-Levels induzieren können (oder höher, vgl. Tab.10), kommen diese *psp*-Expressionsraten *de facto* einer artifiziellen Überproduktion nahe, sodass die physiologische Rolle der Membranbindung und Oligomerisierung in große Komplexe in Zukunft stärker

hinterfragt werden sollte, auch da große PspA-Oligomere zumindest teilweise die Eigenschaften von Proteinaggregaten zeigen.

Die beobachteten Psp-Komplexe *in vivo* könnten GFP-Artefakte sein

Die Theorie, dass PspA *in vivo* in großen Komplexen organisiert und an der Membranstabilisierung beteiligt ist, basiert grundlegend auf den oben erläuterten Beobachtungen von PspA/VIPP1-Oligomeren *in vitro*, sowie auf Studien mit GFP-Fusionen unter Hochinduktionsbedingungen (Engl *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2013; Jovanovic *et al.*, 2014), in denen zwei distinkte Psp-Komplexe in Zellen nachgewiesen werden konnten, ein PspBC-abhängiger, polarer und statischer Komplex, sowie wenige mobilere Komplexe, die ausschließlich aus PspA bestanden. Diese lateralen Komplexe nahmen in den Zellen teilweise helikale Formen an, sodass eine Abhängigkeit dieser Komplexe von MreB postuliert wurde (Engl *et al.*, 2009; sie zeigten sich dort auch nicht in einem $\Delta mreB$ -Stamm). Für den polaren Komplex wurde hier sowohl eine Rolle als Sensor- (Engl *et al.*, 2009) als auch als Effektor vermutet (Yamaguchi *et al.*, 2013). Bei der Interpretation dieser Daten ist zu bedenken, dass GFP-Fusionsuntersuchungen aufgrund der fusionsbedingten Veränderung des Zielproteins artefaktanfällig sind. So zeigten die Lokalisationsveränderungen von GFP- und mCherry-markierten Psp-Proteinen bei Sekretinstress weitgehende Parallelen zu der Lokalisationsveränderung von GFP-PulL und GFP-PulM, Proteine des sekretorischen Pullulanase Systems, nach Überproduktion (Buddelmeijer *et al.*, 2006). PulL und PulM sind kleine interagierende Transmembran-Proteine (wie PspB/PspC), die sich gegenseitig vor Abbau schützen (PspB stabilisiert PspC; Singh und Darwin, 2011; Horstman und Darwin, 2012). Bei moderater Produktion waren GFP-PulL und GFP-PulM schwach detektierbar in der gesamten Zellmembran verteilt (mit einigen etwas stärker fluoreszierenden Foci), lokalisierten bei hoher Produktion jedoch in hell fluoreszierende, unbewegliche und runde Aggregate an den Zellpolen (Buddelmeijer *et al.*, 2006). Eine ähnlich lautende Beschreibung der Veränderung der GFP-PspB/PspC-Lokalisation bei Induktion des *psp*-Systems mit Hochinduktoren findet sich bei Yamaguchi *et al.* (2013), insbesondere auch die Verschiebung

der schwachen Fluoreszenz in hell leuchtende, unbewegliche, am Pol lokalisierte runde Foci, die für Buddelmeijer *et al.* (2006) ein Indiz für die Aggregation der Fusionsproteine darstellen, da eine Anreicherung von Membranproteinen in der polaren Membran zu flacheren und leicht gekrümmten Foci in der Membran führen müsse. Es konnte darüber hinaus am Beispiel Fluoreszenzprotein-markierter Clp-Proteasen gezeigt werden, dass deren als physiologisch relevant eingestuften kleinen Fluoreszenz-Foci (die den lateralen „Effektor“-PspA-Foci stark ähneln) ein Fusionsartefakt darstellen, und dass insbesondere Proteine, die *in vivo* als Homooligomere vorliegen (wie PspA), zur Focibildung durch GFP-*scaffolding* neigen (Landgraf *et al.*, 2012). Die ebenfalls beobachteten helikalen Strukturen, die GFP-PspA ausbilden kann und die als MreB-Abhängigkeit der lateralen PspA-Bewegung interpretiert werden (Jovanovic *et al.*, 2014), sind mit ähnlicher Vorsicht zu deuten, da im Falle von MreB gezeigt werden konnte, dass die Bildung der helikalen Strukturen ein Artefakt der N-terminalen YFP-Fusion darstellt (Swilius und Jensen, 2012).

GFP-PspA-Fusionen führen wie auch *In-vitro*-Modifikationen zum Verlust der PspF-Inhibition

Als Bestätigung der physiologischen Funktionalität von PspA-GFP-Fusionen wird in den entsprechenden Studien auf die Fähigkeit von PspA-GFP verwiesen, nach *pspA-gfp*-Insertion in den natürlichen *pspA*-Locus das *psp*-System ähnlich wie WT-PspA zu regulieren (Yamaguchi *et al.*, 2013). Dies ist in den meisten Fällen annähernd zutreffend (auch wenn das basale Psp-Level teilweise leicht erhöht bzw. die Induktion durch Sekretine beeinträchtigt ist). Jedoch zeigen alle PspA-GFP-Fusionen proteolytische Instabilität (Osadnik, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2013; Jovanovic *et al.*, 2014) und führen zu großen PspA-Fragmenten (>20 kDa) sodass davon ausgegangen werden kann, dass etwa 15– 20 % des PspAs unmarkiert in der Zelle vorliegt. Zieht man die Effektivität der *psp*-Regulation in Betracht (also die langfristige und stabile Bildung eines PspA·F-Komplexes), könnten hier aktive Abbauprodukte ohne GFP die physiologische Nicht-Funktionalität von PspA-GFP

4.1.3 Ein aktiver PspA·F-Komplex im Kontext des aktuellen Psp-Modells

überdecken. Da N-terminal modifiziertes PspA₁₋₁₄₄ *in vitro* nicht mehr mit PspF interagiert (Abb. 30, S.85), sind auch Daten zu N-terminal GFP-fusioniertem PspA interessant, die zeigten, dass sowohl eGFP-WT-PspA als auch eine Variante, in der die FBR1 deletiert war (eGFP-PspA Δ ₂₅₋₄₀) zu einem erhöhten zellulären PspC-Level führen (Jovanovic *et al.*, 2014, Suppl. Fig. 4a). Demnach ist es bei N-terminaler Modifikation von PspA irrelevant, ob das Protein noch eine PspF-Binderegion besitzt oder nicht. So muss in Betracht gezogen werden, dass das für *In-vivo*-Studien verwendete eGFP-PspA (Engl *et al.*, 2009; Jovanovic *et al.*, 2014) physiologisch inaktiv war, und Interpretationen zum Verhalten von PspA *in vivo* auf Basis von eGFP-PspA mit Vorsicht betrachtet werden sollten.

So kann also weder aufgrund der oben diskutierten Aggregat-Ähnlichkeit größerer PspA-Oligomere, noch aufgrund der hier aufgeführten *in vivo* beobachteten Lokalisationen der GFP-Fusionen mit Gewissheit die Existenz physiologisch relevanter PspA-Oligomere angenommen werden. Es besteht vielmehr die Möglichkeit, dass kleinere Einheiten, wie die postulierten di- bzw. trimeren Strukturen von PspA (Abb. 61) die zentral wichtige Oligomerisationsstufe von PspA und anderer Mitglieder der PspA/IM30-Familie darstellen, und größere Strukturen fusions- respektive überproduktions-induzierte Artefakte dieses Proteins sind, womit ein Großteil der postulierten Funktionen des *psp*-Systems an der Membran in Zukunft diskutiert werden muss.

4.3 Quo vadis, PspA?

Im Laufe der Diskussion konnte auf Basis der erhaltenen Daten und bisher publizierter Studien das Konzept eines stabilen, transkriptionsaktiven PspA·F-Komplexes entwickelt werden, welches oberflächlich gesehen der bisherigen Vorstellung der Psp-Antwort widerspricht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass man das *Assoziations-Dissoziations*-Modell als Grenzfall des *Modulator*-Modells der *psp*-Regulation auffassen kann, und somit beide Modelle zwei unterschiedliche Phasen im „regulatorischen Zustandsraum“ des *psp*-System verkörpern können. Weiterhin wurde aufgezeigt, dass bisherige Daten zur Lokalisation und Funktion von PspA auf Basis

von Proteinfusionen in Zukunft kritisch zu hinterfragen sein werden, was ebenfalls für Daten zu hochmolekularen Oligomeren des Proteins gilt. Während somit also, auch aufgrund der ersten Kristallstruktur eines Proteins der PspA/IM30-Familie und der erfolgreichen Identifikation seiner PspF-Bindestellen, ein großer Schritt hin zur Aufklärung der molekularen Funktionsweise der PspA-PspF-Interaktion gemacht werden konnte, bleibt der Mechanismus der Membraninteraktion von PspA weiterhin unklar, ebenso wie eine mögliche Funktion von PspA an der Membran. In der Tat deuten die in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten Ergebnisse zur Bildung größerer PspA-Oligomere, zu den membranlokalisierten Komplexen sowie zur Sensitivität von PspA gegenüber Modifikationen darauf hin, dass die physiologische Rolle der Membraninteraktion und großen Homooligomerisierung überdacht werden sollte, und Alternativen zur Erklärung der Funktion des *psp*-Systems entwickelt werden müssen. Dies gilt insbesondere auch aufgrund der in der Einleitung umrissenen, heterogenen und inkonsistenten Phänotypen, die *psp*-Mutanten zeigen, sowie aufgrund der zumeist mangelnden bis nicht existenten Korrelation von *psp*-Induktionsstärke und Membranschwächung. In diesem Zusammenhang können auch die hier erhaltenen Ergebnisse zu der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne von PspA von Bedeutung sein, die auf die Bildung kleiner Di- oder Trimere durch Proteine der PspA/IM30-Familie hindeuten, und keinen Aufschluss über mögliche höhere Oligomerisierungsgrade geben. In Verbindung mit der Kristallstruktur ergeben sich daher in Zukunft zu beantwortende Fragen, die im bisherigen Verlauf der Diskussion ausgespart wurden, hier aber abschließend kurz skizziert werden sollen.

Sind Proteine der PspA/IM30-Familie evolutionär konservierte AAA+-Regulatoren?

Die interessanteste Frage ist wohl, warum ausgerechnet jener Teil von PspA, der in weiten Teilen zur Interaktion mit PspF benötigt wird (PspA₁₋₁₄₄), der am stärksten konservierte Bereich der Proteine der PspA/IM30-Familie ist. Man könnte sogar so weit gehen, zu behaupten, dass Proteine der PspA/IM30-Familie aus einer PspF-Bindedomäne mit einem kleinen Oligomerisierungs-Anhang be-

4.1.3 Ein aktiver PspA·F-Komplex im Kontext des aktuellen Psp-Modells

stehen (PspA₁₋₁₄₄ und der Linker machen bereits $\frac{3}{4}$ des Proteins aus). Dies ist verwunderlich, da PspF fast nur in Proteobakterien vorkommt, und insbesondere in γ -Proteobacteria (Francke *et al.*, 2011). Man könnte argumentieren, dass die PspF-Bindedomäne auch in *E. coli* noch andere Funktionen (Membraninteraktion, MreB-Interaktion; Jovanovic *et al.*, 2014) besitzt, allerdings scheinen mit der Zuordnung der PspF-Binderegionen sowie der strukturell konservierten Bereiche (NTR, *Tip*) nur noch vereinzelte konservierte Aminosäuren für weitere Funktionen des Proteins in Frage zu kommen, sodass es aus der Konservierung der Primärsequenz und der Kristallstruktur keine Evidenz dafür gibt, dass PspA₁₋₁₄₄ eine deutlich von der PspF-Bindung verschiedene, weitere Funktion hat (außer eventuell eine ClpB-ähnliche Bindung an der *Tip*-Region). Vergegenwärtigt man sich jedoch, dass das zweite PspA/IM30-Protein von *E. coli*, YjfJ, ebenfalls mit PspF interagiert, trotz der deutlich verschiedenen Primärstruktur, wäre eine Rolle von PspA-Proteinen in der Regulation von AAA+-ATPasen eine Möglichkeit, die Konserviertheit dieser Domäne zu erklären. PspA interagiert bekanntermaßen mit PspF, aber auch eine Interaktion mit FtsH, einer membranständigen AAA+-Protease (Langklotz *et al.*, 2012) wurde bereits gezeigt (K. Westphal *et al.*, 2012). Dabei wurde PspA nicht von FtsH abgebaut, sodass die Möglichkeit besteht, dass PspA auch hier modulierend auf die AAA+-ATPase wirkt. AAA+-Domänen sind sich in vielen Fällen sehr ähnlich (Neuwald *et al.*, 1999), sodass eine Zelle mittels mehrerer PspA-ähnlicher Proteine die Aktivität etlicher AAA+-Proteine parallel regulieren könnte. Die Oligomerisierungsdomäne könnte dabei, in Kooperation mit PspB und PspC, di- bzw. trimeres PspA an die Membran binden. So würde ein Komplex gebildet, der eine gewisse Ähnlichkeiten mit dem für RseA-ResB- σ^E beschriebenen Komplex zeigt, in dem σ^E in inaktiver Form an der Membran bereitgehalten, und durch proteolytischen Abbau von ResA entlassen wird (Collinet *et al.*, 2000; Cezairliyan und Sauer, 2007). Hier bietet sich auch die interessante Möglichkeit, dass PspA durch Proteolyse der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne bzw. des vermutlich exponierten Linkers in die hochaktive PspA₁₋₁₄₄-Form überführt werden könnte. Aufgrund seiner hohen regulatorischen Effektivität würden vermutlich geringe Mengen des Fragments für eine effektive PspF-Regulation ausreichen.

Literaturverzeichnis

- Adams, H., Teertstra, W., Demmers, J., Boesten, R. und Tommassen, J. (2003). „Interactions between phage-shock proteins in *Escherichia coli*.“ In: *J Bacteriol* 185.4, S. 1174–1180.
- Adams, H., Teertstra, W., Koster, M. und Tommassen, J. (2002). „PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanese.“ In: *FEBS Lett* 518.1-3, S. 173–176.
- Akoev, V., Gogol, E. P., Barnett, M. E. und Zolkiewski, M. (2004). „Nucleotide-induced switch in oligomerization of the AAA+ ATPase ClpB.“ In: *Protein Sci* 13.3, S. 567–574.
- Aseeva, E., Ossenbühl, F., Eichacker, L. A., Wanner, G., Soll, J. und Vothknecht, U. C. (2004). „Complex formation of Vipp1 depends on its alpha-helical PspA-like domain.“ In: *J Biol Chem* 279.34, S. 35535–35541.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. und Mori, H. (2006). „Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.“ In: *Mol Syst Biol* 2, S. 2006.0008.
- Becker, L. A., Bang, I.-S., Crouch, M.-L. und Fang, F. C. (2005). „Compensatory role of PspA, a member of the phage shock protein operon, in *rpoE* mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.“ In: *Mol Microbiol* 56.4, S. 1004–1016.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J. A. J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B. und Ghigo, J.-M. (2004). „Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression.“ In: *Mol Microbiol* 51.3, S. 659–674.
- Bergler, H., Abraham, D., Aschauer, H. und Turnowsky, F. (1994). „Inhibition of lipid biosynthesis induces the expression of the *pspA* gene.“ In: *Microbiology* 140 (Pt 8), S. 1937–1944.
- Bidle, K. A., Kirkland, P. A., Nannen, J. L. und Maupin-Furlow, J. A. (2008). „Proteomic analysis of *Haloferax volcanii* reveals salinity-mediated regulation of the stress response protein PspA.“ In: *Microbiology* 154.Pt 5, S. 1436–1443.
- Böhl, O. (2014). *Interaktionsstudien zu YjffJ in Escherichia coli*. Leibniz Universität Hannover. Bachelorarbeit.
- Bordes, P., Wigneshweraraj, S. R., Schumacher, J., Zhang, X., Chaney, M. und Buck, M. (2003). „The ATP hydrolyzing transcription activator phage shock protein F of *Escherichia coli*: identifying a surface that binds σ^{54} .“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100.5, S. 2278–2283.

- Brissette, J. L., Russel, M., Weiner, L. und Model, P. (1990). „Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 87.3, S. 862–866.
- Brissette, J. L., Weiner, L., Ripmaster, T. L. und Model, P. (1991). „Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon.“ In: *J Mol Biol* 220.1, S. 35–48.
- Buddelmeijer, N., Francetic, O. und Pugsley, A. P. (2006). „Green fluorescent chimeras indicate nonpolar localization of pullulanase secretion components Pull and PulM.“ In: *J Bacteriol* 188.8, S. 2928–2935.
- Burrows, P. C., Joly, N. und Buck, M. (2010). „A prehydrolysis state of an AAA+ ATPase supports transcription activation of an enhancer-dependent RNA polymerase.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107.20, S. 9376–9381.
- Bury-Moné, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A. und Bouloc, P. (2009). „Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*.“ In: *PLoS Genet* 5.9, e1000651.
- Calloni, G., Chen, T., Schermann, S. M., Chang, H.-C., Genevoux, P., Agostini, F., Tartaglia, G. G., Hayer-Hartl, M. und Hartl, F. U. (2012). „DnaK functions as a central hub in the *E. coli* chaperone network.“ In: *Cell Rep* 1.3, S. 251–264.
- Carroni, M., Kummer, E., Oguchi, Y., Wendler, P., Clare, D. K., Sinning, I., Kopp, J., Mogk, A., Bukau, B. und Saibil, H. R. (2014). „Head-to-tail interactions of the coiled-coil domains regulate ClpB activity and cooperation with Hsp70 in protein disaggregation.“ In: *Elife* 3, e02481.
- Casadaban, M. J. (1976). „Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu.“ In: *J Mol Biol* 104.3, S. 541–555.
- Cezairliyan, B. O. und Sauer, R. T. (März 2007). „Inhibition of regulated proteolysis by RseB.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104.10, S. 3771–3776.
- Chaney, M., Grande, R., Wigneshweraraj, S. R., Cannon, W., Casaz, P., Gallegos, M. T., Schumacher, J., Jones, S., Elderkin, S., Dago, A. E., Morett, E. und Buck, M. (2001). „Binding of transcriptional activators to σ^{54} in the presence of the transition state analog ADP-aluminum fluoride: insights into activator mechanochemical action.“ In: *Genes Dev* 15.17, S. 2282–2294.
- Chen, V. B., Arendall 3rd, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. und Richardson, D. C. (2010). „MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.“ In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66.Pt 1, S. 12–21.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. (1989). „One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86.7, S. 2172–2175.

- Collinet, B., Yuzawa, H., Chen, T., Herrera, C. und Missiakas, D. (Okt. 2000). „RseB binding to the periplasmic domain of RseA modulates the RseA: σ^E interaction in the cytoplasm and the availability of σ^E -RNA polymerase.“ In: *J Biol Chem* 275.43, S. 33898–33904.
- Copeland, R. A., Basavapathruni, A., Moyer, M. und Scott, M. P. (2011). „Impact of enzyme concentration and residence time on apparent activity recovery in jump dilution analysis.“ In: *Anal Biochem* 416.2, S. 206–210.
- Cornell, R. B. und Taneva, S. G. (2006). „Amphipathic helices as mediators of the membrane interaction of amphitropic proteins, and as modulators of bilayer physical properties.“ In: *Curr Protein Pept Sci* 7.6, S. 539–552.
- Darwin, A. J. und Miller, V. L. (2001). „The *psp* locus of *Yersinia enterocolitica* is required for virulence and for growth in vitro when the Ysc type III secretion system is produced.“ In: *Mol Microbiol* 39.2, S. 429–444.
- Datsenko, K. A. und Wanner, B. L. (2000). „One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97.12, S. 6640–6645.
- De Carlo, S., Chen, B., Hoover, T. R., Kondrashkina, E., Nogales, E. und Nixon, B. T. (2006). „The structural basis for regulated assembly and function of the transcriptional activator NtrC.“ In: *Genes Dev* 20.11, S. 1485–1495.
- Desantis, M. E., Sweeny, E. A., Snead, D., Leung, E. H., Go, M. S., Gupta, K., Wendler, P. und Shorter, J. (2014). „Conserved distal loop residues in the Hsp104 and ClpB middle domain contact nucleotide-binding domain 2 and enable Hsp70-dependent protein disaggregation.“ In: *J Biol Chem* 289.2, S. 848–867.
- Dhamdhare, G. und Zgurskaya, H. I. (2010). „Metabolic shutdown in *Escherichia coli* cells lacking the outer membrane channel TolC.“ In: *Mol Microbiol* 77.3, S. 743–754.
- Dworkin, J., Jovanovic, G. und Model, P. (2000). „The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of σ^{54} -dependent transcription.“ In: *J Bacteriol* 182.2, S. 311–319.
- Elderkin, S., Bordes, P., Jones, S., Rappas, M. und Buck, M. (2005). „Molecular determinants for PspA-mediated repression of the AAA transcriptional activator PspF.“ In: *J Bacteriol* 187.9, S. 3238–3248.
- Elderkin, S., Jones, S., Schumacher, J., Studholme, D. und Buck, M. (2002). „Mechanism of action of the *Escherichia coli* phage shock protein PspA in repression of the AAA family transcription factor PspF.“ In: *J Mol Biol* 320.1, S. 23–37.

- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. und Cowtan, K. (2010). „Features and development of Coot.“ In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66.Pt 4, S. 486–501.
- Engl, C., Beek, A. T., Bekker, M., de Mattos, J. T., Jovanovic, G. und Buck, M. (2011). „Dissipation of proton motive force is not sufficient to induce the phage shock protein response in *Escherichia coli*.“ In: *Curr Microbiol* 62.5, S. 1374–1385.
- Engl, C., Jovanovic, G., Lloyd, L. J., Murray, H., Spitaler, M., Ying, L., Errington, J. und Buck, M. (2009). „In vivo localizations of membrane stress controllers PspA and PspG in *Escherichia coli*.“ In: *Mol Microbiol* 73.3, S. 382–396.
- Fink, R. C., Black, E. P., Hou, Z., Sugawara, M., Sadowsky, M. J. und Diez-Gonzalez, F. (2012). „Transcriptional responses of *Escherichia coli* K–12 and O157:H7 associated with lettuce leaves.“ In: *Appl Environ Microbiol* 78.6, S. 1752–1764.
- Francke, C., Groot Kormelink, T., Hagemeyer, Y., Overmars, L., Sluijter, V., Moezelaar, R. und Siezen, R. J. (2011). „Comparative analyses imply that the enigmatic Sigma factor 54 is a central controller of the bacterial exterior.“ In: *BMC Genomics* 12, S. 385.
- Fränzel, B., Penkova, M., Frese, C., Metzler–Nolte, N. und Andreas Wolters, D. (2012). „*Escherichia coli* exhibits a membrane–related response to a small arginine– and tryptophan–rich antimicrobial peptide.“ In: *Proteomics* 12.14, S. 2319–2330.
- García-Fruitós, E., González-Montalbán, N., Morell, M., Vera, A., Ferraz, R. M., Arís, A., Ventura, S. und Villaverde, A. (2005). „Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins.“ In: *Microb Cell Fact* 4, S. 27.
- Guex, N. und Peitsch, M. C. (1997). „SWISS–MODEL and the Swiss–PdbViewer: an environment for comparative protein modeling.“ In: *Electrophoresis* 18.15, S. 2714–2723.
- Guilvout, I., Chami, M., Engel, A., Pugsley, A. P. und Bayan, N. (2006). „Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin.“ In: *EMBO J* 25.22, S. 5241–5249.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. und Beckwith, J. (1995). „Tight regulation, modulation, and high–level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter.“ In: *J Bacteriol* 177.14, S. 4121–4130.
- Hamad, S. W. (2008). *Aspects of Thylakoid Membrane Biogenesis in the Cyanobacterium Synechocystis Sp. PCC 6803: Role of Vipp1 and Chlorophyll Availability*. ProQuest.

- Hankamer, B. D., Elderkin, S. L., Buck, M. und Nield, J. (2004). „Organization of the AAA(+) adaptor protein PspA is an oligomeric ring.“ In: *J Biol Chem* 279.10, S. 8862–8866.
- Haslberger, T., Weibezahn, J., Zahn, R., Lee, S., Tsai, F. T. F., Bukau, B. und Mogk, A. (2007). „M domains couple the ClpB threading motor with the DnaK chaperone activity.“ In: *Mol Cell* 25.2, S. 247–260.
- Hess, B., Kutzner, C., Spoel, D. van der und Lindahl, E. (2008). „GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation.“ In: *Journal of Chemical Theory and Computation* 4.3, S. 435–447.
- Horstman, N. K. und Darwin, A. J. (2012). „Phage shock proteins B and C prevent lethal cytoplasmic membrane permeability in *Yersinia enterocolitica*.“ In: *Mol Microbiol* 85.3, S. 445–460.
- Ize, B., Porcelli, I., Lucchini, S., Hinton, J. C., Berks, B. C. und Palmer, T. (2004). „Novel phenotypes of *Escherichia coli* tat mutants revealed by global gene expression and phenotypic analysis.“ In: *J Biol Chem* 279.46, S. 47543–47554.
- Joly, N. und Buck, M. (2011). „Single chain forms of the enhancer binding protein PspF provide insights into geometric requirements for gene activation.“ In: *J Biol Chem* 286.14, S. 12734–12742.
- Joly, N., Burrows, P. C., Engl, C., Jovanovic, G. und Buck, M. (2009). „A lower-order oligomer form of phage shock protein A (PspA) stably associates with the hexameric AAA(+) transcription activator protein PspF for negative regulation.“ In: *J Mol Biol* 394.4, S. 764–775.
- Joly, N., Schumacher, J. und Buck, M. (2006). „Heterogeneous nucleotide occupancy stimulates functionality of phage shock protein F, an AAA+ transcriptional activator.“ In: *J Biol Chem* 281.46, S. 34997–35007.
- Jovanovic, G., Dworkin, J. und Model, P. (1997). „Autogenous control of PspF, a constitutively active enhancer-binding protein of *Escherichia coli*.“ In: *J Bacteriol* 179.16, S. 5232–5237.
- Jovanovic, G., Weiner, L. und Model, P. (1996). „Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon.“ In: *J Bacteriol* 178.7, S. 1936–1945.
- Jovanovic, G., Engl, C. und Buck, M. (2009). „Physical, functional and conditional interactions between ArcAB and phage shock proteins upon secretin-induced stress in *Escherichia coli*.“ In: *Mol Microbiol* 74.1, S. 16–28.
- Jovanovic, G., Lloyd, L. J., Stumpf, M. P. H., Mayhew, A. J. und Buck, M. (2006). „Induction and function of the phage shock protein extracytoplasmic stress response in *Escherichia coli*.“ In: *J Biol Chem* 281.30, S. 21147–21161.
- Jovanovic, G., Mehta, P., McDonald, C., Davidson, A. C., Uzdaviny, P., Ying, L. und Buck, M. (2014). „The N-terminal amphipathic helices determine regulatory

- and effector functions of phage shock protein A (PspA) in *Escherichia coli*." In: *J Mol Biol* 426.7, S. 1498–1511.
- Kabsch, W. (2010). „XDS.“ In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66.Pt 2, S. 125–132.
- Kammerer, R. A., Kostrewa, D., Proginas, P., Honnappa, S., Avila, D., Lustig, A., Winkler, F. K., Pieters, J. und Steinmetz, M. O. (2005). „A conserved trimerization motif controls the topology of short coiled coils.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102.39, S. 13891–13896.
- Klaus, M. (2013). *Untersuchungen zum Psp-System in Escherichia coli*. Leibniz Universität Hannover. Bachelorarbeit.
- Kleerebezem, M., Crielaard, W. und Tommassen, J. (1996). „Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions.“ In: *EMBO J* 15.1, S. 162–171.
- Kobayashi, R., Suzuki, T. und Yoshida, M. (2007). „Escherichia coli phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes.“ In: *Mol Microbiol* 66.1, S. 100–109.
- Kuczyńska-Wisńik, D., Laskowska, E. und Taylor, A. (2001). „Transcription of the *ibpB* heat-shock gene is under control of σ^{32} - and σ^{54} -promoters, a third regulon of heat-shock response.“ In: *Biochem Biophys Res Commun* 284.1, S. 57–64.
- Laemmli, U. K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ In: *Nature* 227.5259, S. 680–685.
- Landgraf, D., Okumus, B., Chien, P., Baker, T. A. und Paulsson, J. (2012). „Segregation of molecules at cell division reveals native protein localization.“ In: *Nat Methods* 9.5, S. 480–482.
- Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. und Perrakis, A. (2008). „Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7.“ In: *Nat Protoc* 3.7, S. 1171–1179.
- Langklotz, S., Baumann, U. und Narberhaus, F. (Jan. 2012). „Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1823.1, S. 40–48.
- Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S. und Candia, O. A. (1979). „An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate.“ In: *Anal Biochem* 100.1, S. 95–97.
- Lebe, K. (2013). *Untersuchungen zum Psp-System in Escherichia coli*. Leibniz Universität Hannover. Bachelorarbeit.
- Lee, H., Park, H., Ko, J. und Seok, C. (2013). „GalaxyGemini: a web server for protein homo-oligomer structure prediction based on similarity.“ In: *Bioinformatics* 29.8, S. 1078–1080.

- Lee, J.-H., Lennon, C. W., Ross, W. und Gourse, R. L. (März 2012). „Role of the coiled-coil tip of *Escherichia coli* DksA in promoter control.“ In: *J Mol Biol* 416.4, S. 503–517.
- Lee, S., Sowa, M. E., Watanabe, Y.-H., Sigler, P. B., Chiu, W., Yoshida, M. und Tsai, F. T. F. (2003). „The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state.“ In: *Cell* 115.2, S. 229–240.
- Lenn, T., Gkekas, C. N., Bernard, L., Engl, C., Jovanovic, G., Buck, M. und Ying, L. (2011). „Measuring the stoichiometry of functional PspA complexes in living bacterial cells by single molecule photobleaching.“ In: *Chem Commun (Camb)* 47.1, S. 400–402.
- Lesley, S. A., Graziano, J., Cho, C. Y., Knuth, M. W. und Klock, H. E. (2002). „Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein.“ In: *Protein Eng* 15.2, S. 153–160.
- Li, H. M., Kaneko, Y. und Keegstra, K. (1994). „Molecular cloning of a chloroplastic protein associated with both the envelope and thylakoid membranes.“ In: *Plant Mol Biol* 25.4, S. 619–632.
- Lin, Z., Zhou, B., Wu, W., Xing, L. und Zhao, Q. (2013). „Self-assembling amphipathic alpha-helical peptides induce the formation of active protein aggregates in vivo.“ In: *Faraday Discuss* 166, S. 243–256.
- Lindenstrauss, U., Matos, C. F. R. O., Graubner, W., Robinson, C. und Brüser, T. (2010). „Malformed recombinant Tat substrates are Tat-independently degraded in *Escherichia coli*.“ In: *FEBS Lett* 584.16, S. 3644–3648.
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O. und Shaw, D. E. (2010). „Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field.“ In: *Proteins* 78.8, S. 1950–1958.
- Liu, C., Willmund, F., Whitelegge, J. P., Hawat, S., Knapp, B., Lodha, M. und Schroda, M. (2005). „J-domain protein CDJ2 and HSP70B are a plastidic chaperone pair that interacts with vesicle-inducing protein in plastids 1.“ In: *Mol Biol Cell* 16.3, S. 1165–1177.
- Lloyd, L. J., Jones, S. E., Jovanovic, G., Gyaneshwar, P., Rolfe, M. D., Thompson, A., Hinton, J. C. und Buck, M. (2004). „Identification of a new member of the phage shock protein response in *Escherichia coli*, the phage shock protein G (PspG).“ In: *J Biol Chem* 279.53, S. 55707–55714.
- Lupas, A., Van Dyke, M. und Stock, J. (1991). „Predicting coiled coils from protein sequences.“ In: *Science* 252.5009, S. 1162–1164.
- Macé, C., Seyer, D., Chemani, C., Cosette, P., Di-Martino, P., Guery, B., Filloux, A., Fontaine, M., Molle, V., Junter, G.-A. und Jouenne, T. (2008). „Identification of biofilm-associated cluster (bac) in *Pseudomonas aeruginosa* involved in biofilm formation and virulence.“ In: *PLoS One* 3.12, e3897.

- Malpica, R., Sandoval, G. R. P., Rodríguez, C., Franco, B. und Georgellis, D. (2006). „Signaling by the arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression.“ In: *Antioxid Redox Signal* 8.5-6, S. 781–795.
- Mascher, T., Zimmer, S. L., Smith, T.-A. und Helmann, J. D. (2004). „Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*.“ In: *Antimicrob Agents Chemother* 48.8, S. 2888–2896.
- Maxson, M. E. und Darwin, A. J. (2004). „Identification of inducers of the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein system and comparison to the regulation of the RpoE and Cpx extracytoplasmic stress responses.“ In: *J Bacteriol* 186.13, S. 4199–4208.
- (2006). „PspB and PspC of *Yersinia enterocolitica* are dual function proteins: regulators and effectors of the phage–shock–protein response.“ In: *Mol Microbiol* 59.5, S. 1610–1623.
- Mehner, D. (2011). „Charakterisierung und Identifizierung eines Interaktionspartners des Tat-Translokons von *Escherichia coli*“. Diss. Technische Informationsbibliothek und Universitätsbibliothek Hannover.
- Mehta, P., Jovanovic, G., Lenn, T., Bruckbauer, A., Engl, C., Ying, L. und Buck, M. (2013). „Dynamics and stoichiometry of a regulated enhancer–binding protein in live *Escherichia coli* cells.“ In: *Nat Commun* 4.1997.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. BFELki015063 Jeffrey H. Miller Ill., graph. Darst. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, XVI, 466 S.
- Mogk, A., Schlieker, C., Strub, C., Rist, W., Weibezahn, J. und Bukau, B. (2003). „Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity.“ In: *J Biol Chem* 278.20, S. 17615–17624.
- Morito, D., Nishikawa, K., Hoseki, J., Kitamura, A., Kotani, Y., Kiso, K., Kinjo, M., Fujiyoshi, Y. und Nagata, K. (2014). „Moyamoya disease-associated protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state.“ In: *Sci Rep* 4, S. 4442.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. und Dodson, E. J. (1997). „Refinement of macromolecular structures by the maximum–likelihood method.“ In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53.Pt 3, S. 240–255.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. und Koonin, E. V. (1999). „AAA+: A class of chaperone–like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes.“ In: *Genome Res* 9.1, S. 27–43.

- Oguchi, Y., Kummer, E., Seyffer, F., Berynsky, M., Anstett, B., Zahn, R., Wade, R. C., Mogk, A. und Bukau, B. (2012). „A tightly regulated molecular toggle controls AAA+ disaggregase.“ In: *Nat Struct Mol Biol* 19.12, S. 1338–1346.
- Ogura, T. und Wilkinson, A. J. (2001). „AAA+ superfamily ATPases: common structure–diverse function.“ In: *Genes Cells* 6.7, S. 575–597.
- Osadnik (2009). *Untersuchungen zu Struktur, Funktion und Interaktion des phage shock protein A (PspA) aus Escherichia coli*. Martin–Luther–Universität Halle–Wittenberg. Diplomarbeit.
- Overmann, J., Fischer, U. und Pfennig, N. (1992). „A New Purple Sulfur Bacterium from Saline Littoral Sediments, *Thiorhodovibrio winogradskyi* gen. nov. and sp. nov.“ In: *Archives of Microbiology* 157.4, S. 329–335.
- Pioszak, A. A. und Ninfa, A. J. (2004). „Mutations altering the N-terminal receiver domain of NRI (NtrC) That prevent dephosphorylation by the NRII-PII complex in *Escherichia coli*.“ In: *J Bacteriol* 186.17, S. 5730–5740.
- Popham, D. L., Szeto, D., Keener, J. und Kustu, S. (1989). „Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers.“ In: *Science* 243.4891, S. 629–635.
- Poranen, M. M., Ravantti, J. J., Grahn, A. M., Gupta, R., Auvinen, P. und Bamford, D. H. (2006). „Global changes in cellular gene expression during bacteriophage PRD1 infection.“ In: *J Virol* 80.16, S. 8081–8088.
- Punta, M., Coghill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R., Bateman, A. und Finn, R. D. (2012). „The Pfam protein families database.“ In: *Nucleic Acids Res* 40.Database issue, S. D290–D301.
- R Core Team (2013). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Rappas, M., Schumacher, J., Beuron, F., Niwa, H., Bordes, P., Wigneshweraraj, S., Keetch, C. A., Robinson, C. V., Buck, M. und Zhang, X. (2005). „Structural insights into the activity of enhancer–binding proteins.“ In: *Science* 307.5717, S. 1972–1975.
- Rappas, M., Schumacher, J., Niwa, H., Buck, M. und Zhang, X. (2006). „Structural basis of the nucleotide driven conformational changes in the AAA+ domain of transcription activator PspF.“ In: *J Mol Biol* 357.2, S. 481–492.
- Rose, A., Schraegle, S. J., Stahlberg, E. A. und Meier, I. (2005). „Coiled-coil protein composition of 22 proteomes–differences and common themes in subcellular infrastructure and traffic control.“ In: *BMC Evol Biol* 5, S. 66.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*. 3. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schägger, H. (2006). „Tricine-SDS-PAGE.“ In: *Nat Protoc* 1.1, S. 16–22.
- Schirmer, E. C., Homann, O. R., Kowal, A. S. und Lindquist, S. (2004). „Dominant gain-of-function mutations in Hsp104p reveal crucial roles for the middle region.“ In: *Mol Biol Cell* 15.5, S. 2061–2072.
- Schröder, I., Darie, S. und Gunsalus, R. P. (1993). „Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (narGHJI) operon by NarL and Fnr requires integration host factor.“ In: *J Biol Chem* 268.2, S. 771–774.
- Schrodinger, L. (2010). „The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1“.
- Schuck, P. (2000). „Size–distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling.“ In: *Biophys J* 78.3, S. 1606–1619.
- Schumacher, J., Zhang, X., Jones, S., Bordes, P. und Buck, M. (2004). „ATP-dependent transcriptional activation by bacterial PspF AAA+protein.“ In: *J Mol Biol* 338.5, S. 863–875.
- Sen, M., Maillard, R. A., Nyquist, K., Rodriguez–Aliaga, P., Pressé, S., Martin, A. und Bustamante, C. (2013). „The ClpXP protease unfolds substrates using a constant rate of pulling but different gears.“ In: *Cell* 155.3, S. 636–646.
- Seo, J., Savitzky, D. C., Ford, E. und Darwin, A. J. (2007). „Global analysis of tolerance to secretin-induced stress in *Yersinia enterocolitica* suggests that the phage-shock-protein system may be a remarkably self-contained stress response.“ In: *Mol Microbiol* 65.3, S. 714–727.
- Seyffer, F., Kummer, E., Oguchi, Y., Winkler, J., Kumar, M., Zahn, R., Sourjik, V., Bukau, B. und Mogk, A. (2012). „Hsp70 proteins bind Hsp100 regulatory M domains to activate AAA+ disaggregase at aggregate surfaces.“ In: *Nat Struct Mol Biol* 19.12, S. 1347–1355.
- Sharma, A., Leach, R. N., Gell, C., Zhang, N., Burrows, P. C., Shepherd, D. A., Wigneshweraraj, S., Smith, D. A., Zhang, X., Buck, M., Stockley, P. G. und Tuma, R. (2014). „Domain movements of the enhancer–dependent sigma factor drive DNA delivery into the RNA polymerase active site: insights from single molecule studies.“ In: *Nucleic Acids Res* 42.8, S. 5177–5190.
- Sheldrick, G. M. (2010). „Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification.“ In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66.Pt 4, S. 479–485.
- Siegert, R., Leroux, M. R., Scheuffler, C., Hartl, F. U. und Moarefi, I. (2000). „Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins.“ In: *Cell* 103.4, S. 621–632.
- Singh, S. und Darwin, A. J. (2011). „FtsH-dependent degradation of phage shock protein C in *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli*.“ In: *J Bacteriol* 193.23, S. 6436–6442.

- Spagnuolo, J., Opalka, N., Wen, W. X., Gagic, D., Chabaud, E., Bellini, P., Bennett, M. D., Norris, G. E., Darst, S. A., Russel, M. und Rakonjac, J. (2010). „Identification of the gate regions in the primary structure of the secretin pIV.“ In: *Mol Microbiol* 76.1, S. 133–150.
- Standar, K., Mehner, D., Osadnik, H., Berthelmann, F., Hause, G., Lünsdorf, H. und Brüser, T. (2008). „PspA can form large scaffolds in *Escherichia coli*.“ In: *FEBS Lett* 582.25-26, S. 3585–3589.
- Swulius, M. T. und Jensen, G. J. (2012). „The helical MreB cytoskeleton in *Escherichia coli* MC1000/pLE7 is an artifact of the N-Terminal yellow fluorescent protein tag.“ In: *J Bacteriol* 194.23, S. 6382–6386.
- Sysoeva, T. A., Chowdhury, S., Guo, L. und Nixon, B. T. (2013). „Nucleotide-induced asymmetry within ATPase activator ring drives σ^{54} -RNAP interaction and ATP hydrolysis.“ In: *Genes Dev* 27.22, S. 2500–2511.
- Terhorst, P. (2014). *Regulation studies of yjfI and the Yjf system*. Leibniz Universität Hannover. Bachelorarbeit.
- Thomason, L. C., Costantino, N. und Court, D. L. (2007). „E. coli genome manipulation by P1 transduction.“ In: *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 1, Unit 1.17.
- Tummino, P. J. und Copeland, R. A. (2008). „Residence time of receptor–ligand complexes and its effect on biological function.“ In: *Biochemistry* 47.20, S. 5481–5492.
- Turgay, K., Hamoen, L. W., Venema, G. und Dubnau, D. (1997). „Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*.“ In: *Genes Dev* 11.1, S. 119–128.
- Valgepea, K., Adamberg, K., Seiman, A. und Vilu, R. (2013). „*Escherichia coli* achieves faster growth by increasing catalytic and translation rates of proteins.“ In: *Mol Biosyst* 9.9, S. 2344–2358.
- van der Laan, M., Urbanus, M. L., Ten Hagen-Jongman, C. M., Nouwen, N., Oudega, B., Harms, N., Driessen, A. J. M. und Luirink, J. (2003). „A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100.10, S. 5801–5806.
- Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. und Clardy, J. (1993). „Atomic structures of the human immunophilin FKBP–12 complexes with FK506 and rapamycin.“ In: *J Mol Biol* 229.1, S. 105–124.
- Vega, N. M., Allison, K. R., Khalil, A. S. und Collins, J. J. (2012). „Signaling-mediated bacterial persister formation.“ In: *Nat Chem Biol* 8.5, S. 431–433.
- Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P. und Bricogne, G. (2007). „Automated structure solution with autoSHARP.“ In: *Methods Mol Biol* 364, S. 215–230.

- Vrancken, K., Van Mellaert, L. und Anné, J. (2008). „Characterization of the *Streptomyces lividans* PspA response.“ In: *J Bacteriol* 190.10, S. 3475–3481.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. und Gay, N. J. (1982). „Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.“ In: *EMBO J* 1.8, S. 945–951.
- Walton, T. A. und Sousa, M. C. (2004). „Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation.“ In: *Mol Cell* 15.3, S. 367–374.
- Wang, L., Guo, Y. und Gralla, J. D. (1999). „Regulation of σ^{54} -dependent transcription by core promoter sequences: role of -12 region nucleotides.“ In: *J Bacteriol* 181.24, S. 7558–7565.
- Watanabe, Y., Nakazaki, Y., Suno, R. und Yoshida, M. (2009). „Stability of the two wings of the coiled-coil domain of ClpB chaperone is critical for its disaggregation activity.“ In: *Biochem J* 421.1, S. 71–77.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. und Barton, G. J. (2009). „Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench.“ In: *Bioinformatics* 25.9, S. 1189–1191.
- Watt, A. D., Perez, K. A., Rembach, A., Sherrat, N. A., Hung, L. W., Johanssen, T., McLean, C. A., Kok, W. M., Hutton, C. A., Fodero-Tavoletti, M., Masters, C. L., Villemagne, V. L. und Barnham, K. J. (2013). „Oligomers, fact or artefact? SDS-PAGE induces dimerization of β -amyloid in human brain samples.“ In: *Acta Neuropathol* 125.4, S. 549–564.
- Weber, A., Kögl, S. A. und Jung, K. (2006). „Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*.“ In: *J Bacteriol* 188.20, S. 7165–7175.
- Weiner, L., Brissette, J. L. und Model, P. (1991). „Stress-induced expression of the *Escherichia coli* phage shock protein operon is dependent on σ^{54} and modulated by positive and negative feedback mechanisms.“ In: *Genes Dev* 5.10, S. 1912–1923.
- Weiner, L., Brissette, J. L., Ramani, N. und Model, P. (1995). „Analysis of the proteins and cis-acting elements regulating the stress-induced phage shock protein operon.“ In: *Nucleic Acids Res* 23.11, S. 2030–2036.
- Weiner, L. und Model, P. (1994). „Role of an *Escherichia coli* stress-response operon in stationary-phase survival.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91.6, S. 2191–2195.
- Westphal, K., Langklotz, S., Thomanek, N. und Narberhaus, F. (2012). „A trapping approach reveals novel substrates and physiological functions of the essential protease FtsH in *Escherichia coli*.“ In: *J Biol Chem* 287.51, S. 42962–42971.

- Westphal, S., Heins, L., Soll, J. und Vothknecht, U. C. (2001). „*Vipp1* deletion mutant of *Synechocystis*: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis?“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.7, S. 4243–4248.
- Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Sylatk, C., Mattes, R., Siemann, M. und Altenbuchner, J. (2001). „High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* *rhaBAD* promoter.“ In: *Biotechnol Bioeng* 73.2, S. 95–103.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A. und Wilson, K. S. (2011). „Overview of the CCP4 suite and current developments.“ In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67.Pt 4, S. 235–242.
- Wolf, E., Kim, P. S. und Berger, B. (1997). „MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils.“ In: *Protein Sci* 6.6, S. 1179–1189.
- Yamaguchi, S., Gueguen, E., Horstman, N. K. und Darwin, A. J. (2010). „Membrane association of PspA depends on activation of the phage-shock-protein response in *Yersinia enterocolitica*.“ In: *Mol Microbiol* 78.2, S. 429–443.
- Yamaguchi, S., Reid, D. A., Rothenberg, E. und Darwin, A. J. (2013). „Changes in Psp protein binding partners, localization and behaviour upon activation of the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein response.“ In: *Mol Microbiol* 87.3, S. 656–671.
- Zhang, N., Joly, N. und Buck, M. (2012). „A common feature from different subunits of a homomeric AAA+ protein contacts three spatially distinct transcription elements.“ In: *Nucleic Acids Res* 40.18, S. 9139–9152.
- Zhang, N., Simpson, T., Lawton, E., Uzdevinys, P., Joly, N., Burrows, P. und Buck, M. (2013). „A key hydrophobic patch identified in an AAA+ protein essential for its in trans inhibitory regulation.“ In: *J Mol Biol* 425.15, S. 2656–2669.
- Zietkiewicz, S., Slusarz, M. J., Slusarz, R., Liberek, K. und Rodziewicz-Motowidło, S. (2010). „Conformational stability of the full-atom hexameric model of the ClpB chaperone from *Escherichia coli*.“ In: *Biopolymers* 93.1, S. 47–60.

Danksagung

Ich möchte mich bei Thomas Brüser für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken, die Diskussionen und Ratschläge, insbesondere auch dafür, dass er mir — bei aller Unterstützung — die Freiheit gegeben hat, eigene Wege gehen zu können.

Kürşad Turgay danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie die angeregten Diskussionen zum Thema Psp und Clp.

Bei Gary Sawers möchte ich mich für die Übernahme des Drittgutachtens bedanken.

Hauke Lilie danke ich für die Messungen mittels Analytischer Ultrazentrifugation, Michael Schöpfel, Christoph Parthier und Milton Stubbs für die Lösung der PspA-Struktur, und Jelger Risselada für die Durchführung der Simulationen.

Sybille bin ich für die Übernahme vieler molekularbiologischen Arbeiten zu allergrößtem Dank verpflichtet, ohne sie wäre das Thema Psp nicht dort wo es jetzt ist.

Inge danke ich insbesondere für die Phagentransduktionen und Armgard für die generelle Hilfe bei vielen kleinen Arbeiten im Labor.

Noël gilt ebenfalls großer Dank für die unzähligen Diskussionen, das Korrekturlesen des Papers sowie auch dieser Arbeit. Denise danke ich für die unermüdliche Unterstützung seit der ersten Stunde damals in Halle.

Den anderen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Institutes für Mikrobiologie sowie der ehemaligen AG Brüser in Halle, Claudia, Patrick, Astrid, Hannes, Bo, Heinrich, Michael, Eyleen, Frau Lindenstrauss und allen die ich hier nicht erwähne danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit und die vielen schönen Stunden.

Allen Studierenden, mit denen ich in den letzten Jahren auf meinem Gebiet zusammenarbeiten durfte, danke ich ebenfalls für ihr Engagement.

Größter Dank gilt meiner Familie und Maja.

Lebenslauf

Name: Hendrik Gerhard Osadnik
Geburtsdatum/-ort: 6.3.1983 in Gelsenkirchen

Schulische Ausbildung

1993-2002 Besuch des „Gymnasium Petrinum“ in Recklinghausen. Abschluss Abitur

Studium

2003-2004 Studium an der Hochschule für Musik und Theater „Felix-Mendelssohn-Bartholdy“ in Leipzig, Studiengang „Diplom-Pianist“

2004-2009 Studium an der „Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg“ in Halle (Saale)

10/2008-07/2009 Diplomarbeit am Institut für Biologie, Bereich Mikrobiologie, Betreuung: Prof. Gary Sawers

2009 Abschluss des Studiums und Erlangung des akad. Grades „Diplom-Biologe“ („Mit Auszeichnung“). Titel der Diplomarbeit: „Untersuchungen zu Struktur, Funktion und Interaktion des *phage shock protein A* aus *Escherichia coli*.“

Universitäre Arbeit

10/2009-03/2010 Mitarbeiter in der AG Dr. Brüser (MLU Halle)

ab 4/2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie der Leibniz Universität Hannover