

**Konservierte Struktur bei genetischer Mosaizität:
Die Tailspike Proteine dreier Phagen
der Familie Podoviridae**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Biochemie.

Eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Dipl.-Chem. Stefanie Barbirz,
Potsdam, den 14.11.2005.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Proteine aus Bakteriophagen: Beispiele für Zucker bindende β -Proteinstrukturmotive	1
1.2. Das Motiv der parallelen β -Helix	6
1.3. Das Modellsystem des Tailspike Proteins des Bakteriophagen P22	10
1.4. Neue Tailspike Proteine aus Bakteriophagen mit rechtsgängigen, oligomeren β -Helices	14
1.5. Aufgabenstellung	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.2. Molekularbiologische Methoden	23
2.3. Proteinchemische Methoden	25
2.4. Faltungsmethoden	28
2.5. Herstellung von Kohlenhydraten, Kohlenhydratanalytik und Enzymtests	30
2.6. Spektroskopische und massenspektrometrische Methoden	32
2.7. Kristallographische Methoden	34
3. Untersuchungen am Tailspike Protein des Bakteriophagen HK620	37
3.1. Herstellung, Reinigung und biochemische Charakterisierung	37
3.2. Stabilitätsuntersuchungen an HK620TSP	49
3.3. Kristallisation und Röntgenbeugungsexperimente	58
3.4. Biologische Aktivität von HK620TSP	61
4. Untersuchungen am Tailspike Protein des Bakteriophagen Sf6	66
4.1. Röntgenkristallstrukturanalyse von Sf6TSP Δ N	66
4.2. Beschreibung und Diskussion des Strukturmodells von Sf6TSP Δ N	71
4.3. Untersuchungen zur Identifizierung der Substratbindestelle von Sf6TSP	85
5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	91
6. Literaturverzeichnis	97

Abkürzungen

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
amu	<i>atomic mass units</i>
CD	Circular Dichroismus
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-MS-TOF	Electrospray Ionization Mass Spectrometry / Time of Flight
FT-IR	Fourier Transform Infrarot Spektroskopie
Gal	D-Galactose
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GdmCl	Guanidinium Hydrochlorid
Glc	D-Glukose
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
gp	<i>gene product</i>
HK620TSP	HK620 Tailspike Protein
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Geschwindigkeitskonstante
kD	Kilodalton
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry</i>
min	Minuten
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Mr	relative Molekularmasse
OD	optische Dichte
P22TSP	P22 Tailspike Protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
Rha	L-Rhamnose
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAD	Single anomalous dispersion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SeMet	Selenomethionin
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
Sf6TSP	Sf6 Tailspike Protein
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
Tris	Trishydroxyaminomethylmethan
TSP	Tailspike Protein
TSP ΔN	Tailspike Protein ohne die N-terminale Kopfbindedomäne
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumenanteile
(w/v)	Gewichtsanteile

Für Aminosäuren werden sowohl die Dreibuchstaben- als auch die Einbuchstaben-Standardabkürzungen verwendet.

1. Einleitung

1.1. Proteine aus Bakteriophagen: Beispiele für Zucker bindende β -Proteinstrukturmotive

1.1.1. Vorkommen und Morphologie von Bakteriophagen

Viren gelten in der Natur nicht als Lebewesen, weil sie keinen Stoffwechsel haben und auf eine Wirtszelle angewiesen sind. Sie bedienen sich der belebten Natur zur Informationsweitergabe in Form von Nukleinsäureverbindungen. Dabei setzt die Weitergabe von leblosen Informationsmolekülen aber zwangsläufig die Existenz des Lebens voraus, bedingt diese und wird durch sie ermöglicht.

Bakteriophagen sind die Viren der Bakterien. Sie wurden als Bakterien lysierende Agentien zu Beginn des 20. Jahrhunderts unabhängig voneinander von Twort und d'Herelle beschrieben (Duckworth, 1994). Das Wort „Phage“ leitet sich dabei vom griechischen Verb „phagein“ – fressen – ab. Phagen sind weit verbreitet. Man schätzt, dass allein in den Ozeanen rund 10^9 Phagen pro Liter Seewasser vorkommen (Suttle, 2005). Phagenome verändern sich schnell und tauschen dabei allein im Meer pro Jahr schätzungsweise 10^{25} bis 10^{28} DNS-Basenpaare aus (Rohwer & Edwards, 2002). Systematisiert werden die Viren nach Art und Form der Nukleinsäure, der Morphologie und dem Vorhandensein einer Membranhülle (Modrow & Falke, 1997). Neuere Systeme schlagen jedoch auch die Klassifizierung anhand genetischer Marker vor (Rohwer & Edwards, 2002). Die Bakteriophagen werden in der Nomenklatur nach Bradley in 13 Morphologiefamilien eingeteilt (Bradley, 1967). Bis zum Jahr 2000 sind mehr als 5100 Bakterienviren elektronenmikroskopisch untersucht und morphologisch beschrieben worden, 96 % davon gehören dabei zu den Schwanzphagen (Ackermann, 2001). Andere Morphotypen machen nur ca. 3.6 % der bekannten Bakteriophagen aus. Dabei spiegelt diese Verteilung vermutlich nicht die tatsächlich in der Natur auftretenden Zahlen wider. Sie zeigt vielmehr den jeweiligen Stand der Technik in der Mikrobiologie und dass bestimmte Organismen Forschungsschwerpunkte darstellen. Deshalb werden auch überdurchschnittlich viele Phagen der γ Proteobakterien gefunden, zu denen z.B. die ausführlich untersuchten Spezies *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* oder *Escherichia coli* gehören. Sie sind unter anderem Wirte für die Phagen des Morphologietyps *Podoviridae*. Die in dieser Arbeit beschriebenen Tailspike Proteine sind die Schwanzfasern von Viren dieses Typs. Die *Podoviridae* enthalten lineare, doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (dsDNS Phagen). Sie haben nur einen kurzen Schwanz im Vergleich zum Phagen T4 (*Myoviridae*) mit langem, kontrahierbarem, oder zum Phagen λ (*Siphoviridae*) mit langem, nicht kontrahierbarem Schwanz. Im Jahr 2000 waren 664 *Podoviridae* beschrieben (Ackermann, 2001). Bei dsDNS Phagen werden lytische und temperente Phagen unterschieden: Lytische dsDNS Phagen programmieren bakterielle Zellen bei der Infektion sofort auf die Synthese neuer Phagen um. Diese werden an-

schließlich aus dem toten Bakterium freigesetzt. Temperente dsDNS Phagen können sich auf die gleiche Art wie die lytischen Phagen vermehren, sind aber auch in der Lage, eine stabile Verbindung mit dem Wirtszellgenom einzugehen. Die Phagen-DNS wird dann gemeinsam mit dem Wirtschromosom repliziert. Der Phage wird in diesem Zustand als Prophage bezeichnet, er befindet sich im lysogenen Zyklus. Durch so genannte Induktion, z.B. durch Bestrahlung oder Chemikalien, können aus Prophagen im lytischen Zyklus neue Viren freigesetzt werden. Ihre Entdeckung im Labor verdanken z.B. die Schwanzphagen λ , P22, P1 und P2, P4 und N15 der Freisetzung aus lysogenen Bakterien (Casjens, 2003). Man vermutet, dass der Genpool temperenter Phagen sich zum Großteil in Prophagen befindet. Im Jahr 2004 enthielten 125 der bis dahin publizierten bakteriellen Genome die Genome von mindestens 300 Prophagen (Casjens *et al.*, 2004). Die Phageng Genome sind mosaikartig aufgebaut. Dabei legen ähnliche Transkriptionsprogramme nahe, dass es zu Genaustauschen gekommen ist. Dieser horizontale Gentransfer ist möglich, wenn unterschiedliche Phagen ihr Genom in das Chromosom derselben Wirtszelle integrieren. Gentransfer wurde unter anderem zwischen den lambdoiden Phagen von *E. coli*, beim *Salmonella*-Phagen P22 und bei den *Shigella*-Phagen SfV und Sf6 beobachtet (Casjens, 2003). Als „Lambdoide Phagen“ wurden ursprünglich solche bezeichnet, die mit der DNA des Phagen λ rekombinante Hybride ausbilden. Entsprechend sind P22 und HK620 lambdoide Phagen, die direkt mit λ Hybride bilden (Botstein & Herskowitz, 1974; Dhillon *et al.*, 1998). APSE-1 und Sf6 gehören auch zur Familie der lambdoiden Phagen, weil sie ähnliche Proteinsequenzen wie P22 und HK620 enthalten, obwohl sie mit λ keine Hybride bilden können (Clark *et al.*, 2001; van der Wilk *et al.*, 1999).

1.1.2. Interaktion viraler Fasern mit Kohlenhydraten

Erkennt ein Viruspartikel seine Wirtszelle, so ist dies meist die erste Stufe einer viralen Infektion. Die erste biochemische Wechselwirkung findet dabei oft zwischen Kohlenhydratrezeptoren auf der Zelloberfläche und einem spezifischen viralen Adhäsion statt, so dass an dieser Stelle der Infektionsprozess durch antivirale Agentien blockiert werden könnte (Lentz, 1990). Viele Viren besitzen Rezeptor-inaktivierende enzymatische Aktivität (Lindberg, 1977), wie z.B. die Neuraminidasen aus *Haemophilus Influenzae* A und B und

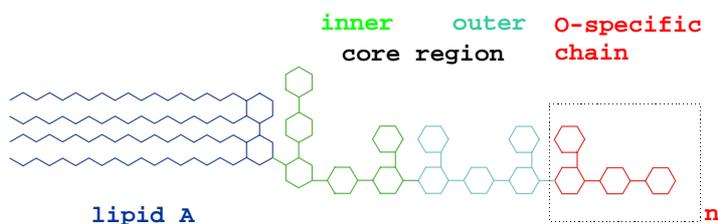


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Lipopolysaccharids eines gram-negativen Bakteriums. Das O-Antigen ist ein Rezeptor für Bakteriophagen der Morphologie *Podoviridae*. Sechsecke symbolisieren Saccharidbausteine, Zick-Zack-Linien Fettsäuren (Baxa, 1998; Schlegel, 1992).

dem Paramyxovirus (Matrosovich *et al.*, 2004), die N-acetylmuraminsäure freisetzen. Acetyleraseaktivität findet man bei *Haemophilus Influenzae* C (Herrler *et al.*, 1992) und den Coronaviren (Smits *et al.*, 2005; Strasser *et al.*, 2004). Phagen von *E. coli*, *S. enterica* und *Klebsiella* besit-

zen ebenfalls Acetylerasen oder sind Endoglykosidasen (Lindberg, 1977). Die Polysialinsäuren der Kapsel von *E. coli* K1 werden von den K1-spezifischen Phagen ϕ K1E, ϕ K1F, 63D und ϕ K1-5 gespalten (Stummeyer *et al.*, 2005). Das O-Antigen des Lipopolysaccharids gram-negativer Bakterien ist ein Rezeptor für Tailspike Proteine der Phagen des Morphologietyps *Podoviridae*. Es handelt sich dabei um ein Polysaccharid aus repetitiv angeordneten Oligosaccharidbausteinen (*repetitive units*, RUs), deren Zusammensetzung je nach Zell- und Serotyp stark variiert. Über eine im Aufbau dagegen wenig variable Core-Zuckerstruktur ist das O-Antigen an das Lipid A gebunden, das das Molekül in der Membran verankert (Abbildung 1). Bei der Infektion mit einem temperenten Phagen beobachtet man in der Wirtszelle im lysogenen Zyklus eine Veränderung der O-Antigenstruktur. Diese lysogene Konversion wird durch Gene des Phagen verursacht, die die Lipopolysaccharidsynthese modifizieren und so das Eindringen weiterer Phagen verhindern (Brussow *et al.*, 2004). Die Endoglykosidaseaktivität von Phagenproteinen gegen das O-Antigen der Wirtszelle wurde insbesondere für *Salmonella*-Phagen beschrieben und untersucht. Die Phagen P22, 28B, 36 und ϵ 15 sind Endorhamnosidasen (Eriksson *et al.*, 1979; Kanegasaki & Wright, 1973; Svenson *et al.*, 1979). Endorhamnosidaseaktivität findet man aber auch beim *Shigella*-Phagen Sf6 und beim Coliphagen Ω 8 (Lindberg *et al.*, 1978; Reske *et al.*, 1973). Dabei ist das O-Antigen als primärer Rezeptor für die Wirtserkennung zuständig. Notwendige Bedingung für die DNA-Injektion ist jedoch auch ein sekundärer Rezeptor. Dies wurde bei der Inkubation von Phagen mit reinem Polysaccharid gezeigt, die keine DNA-Ausstoßung hervorruft (Eriksson & Lindberg, 1977; Takeda & Uetake, 1973). Lokalisation und Funktionsweise eines sekundären Rezeptors sind jedoch ungeklärt. Unklar ist auch, warum viele Phagen ihre Rezeptoren z.B. durch Spaltung inaktivieren. Dazu wurde vorgeschlagen, dass sich der Bakteriophage zunächst seinen Weg durch den „Dschungel“ von Polysaccharidmolekülen, die Glykocalix, bahnen muss, bevor eine Stelle erreicht ist, an der sich die beiden Zellmembranen so nahe kommen, dass eine DNA-Injektion ins Cytosol möglich ist (Bayer *et al.*, 1980; Israel, 1978; Lindberg, 1977). Nach einem anderen Erklärungsversuch soll die den Rezeptor zerstörende Aktivität verhindern, dass neu synthetisierte Phagen bei der Zelllyse an Zellwandbruchstücke binden (Liu *et al.*, 1995).

1.1.3. Virale Faserproteine mit β -Sekundärstruktur

Da sich Bakteriophagen im extrazellulären Raum aufhalten, müssen die sie aufbauenden Proteine stabil gegen extreme Umwelteinflüsse wie hohe Temperatur oder Proteasen sein. Diese Stabilität wird zum einen durch die Assemblierung zu multimeren Proteinverbänden z.B. in den Kapsidstrukturen erreicht. Zum anderen findet man die funktionsbedingt stärker lösungsmittel-exponierten Erkennungs- und Anheftungsorganellen. Diese oft faserförmigen Proteine sind durch Oligomerisierung und spezielle Faltungsmotive kinetisch hoch stabilisiert; im Labor ist diese Stabilität oft als SDS-Resistenz in der SDS-PAGE auffällig (Manning & Colon, 2004). Der Röntgenstrukturanalyse dieser Protei-

ne sind im allgemeinen nur durch limitierte Proteolyse erhaltene, besonders stabile Proteinfragmente zugänglich (Mitraki *et al.*, 2002; Weigele *et al.*, 2003).

Viele virale Faserproteine haben einen hohen Anteil an β -Sekundärstruktur und sind modular aufgebaut. Ihre mechanische Stabilität erhalten sie durch eine rigide, stäbchenförmige Architektur, die vermutlich das Eindringen in die Wirtszelle erleichtert (Mitraki *et al.*, 2002). Alle bislang bekannten Strukturen falten zu nativen Trimeren. In ihnen wurden neue β -Faltblatt Supersekundärstruktur motive identifiziert, aus denen die Proteine meist modular aufgebaut sind (Abbildung 2). Das Faserprotein des Adenovirus Ad2 und das Anheftungsprotein $\sigma 1$ des Reovirus enthalten eine trimere β -Spirale (*triple β -spiral*) (Chappell *et al.*, 2002; van Raaij *et al.*, 1999). In der Primärstruktur findet man Sequenzwiederholungen (*repeats*) von hydrophoben Resten sowie eine konservierte Position für Prolin oder Glycin. Beides kann für die *triple β -spiral* als charakteristisch angesehen werden. In der kurzen Schwanzfaser des Bakteriophagen T4 (*T4 short tail fibre*, gp12) wird ein ähnliches Faltungsmotiv gefunden, es enthält aber keine *repeats*. In demselben Protein gp12 wurde erstmalig die Struktur einer trimeren, verwundenen β -Helix (*triple β -helix*) identifiziert, in der die β -Stränge dreier Monomere parallele, intermolekulare Faltblätter ausbilden, die durch kurze Abschnitte (*linker*) miteinander verbunden sind (van Raaij *et al.*, 2001). Eine *triple β -helix* befindet sich auch am C-Terminus des Proteins gp5 des zentralen Basisplattenkomplexes des Phagen T4. Sie durchstößt zur DNA-Injektion die äußere Zellmembran der Wirtszelle (Kanamaru *et al.*, 2002). Das gleiche Motiv ist außerdem in der Endosialidase (endoNF) des Bakteriophagen $\phi K1F$ enthalten (Stummeyer *et al.*, 2005). Die *triple β -helix* zeigt charakteristische *repeats* von Prolin und Glycin in den *linker*-Regionen zwischen den Faltblättern sowie *repeats* polarer Reste (gp5) bzw. hydrophober Reste (gp12). Im Tailspike Protein des Bakteriophagen P22 findet man schließlich eine oligomere, parallele β -Helix (Abbildung 5). Dieses Strukturmotiv wird in Abschnitt 1.3.1. ausführlich erörtert.

Die Faltungswege der neuen Supersekundärstruktur motive sind noch nicht untersucht worden. Es wurde postuliert, dass die hohe Stabilität der bisher bekannten oligomeren Faserproteine auf die Verwindung ihrer Untereinheiten zurückzuführen sei (van Raaij *et al.*, 2001). Systematische Untersuchungen zum Faltungsweg intermolekularer Supersekundärstrukturen vom β -Typ existieren bisher nur für das Tailspike Protein des Bakteriophagen P22 (P22TSP) (Seckler, 1998) (siehe Abschnitt 1.3.1.). Grundsätzlich handelt es sich aber vermutlich um sehr langsame Faltungsereignisse. Als Indiz dafür kann der Einfluss von Chaperonen bei der *in vivo* Faltung viraler Faserproteine angesehen werden. Sie müssen teilgefaltete Spezies an der Aggregation hindern; dies wurde bereits in frühen Arbeiten zur *in vivo*- und *in vitro*-Faltung der *T4 short tail fibre* vermutet: Hohe Faltungsausbeuten erhält man nur in Gegenwart des Bakteriophagen T4 Chaperons gp57 (King & Laemmli, 1971). Eine Frage bei der Assemblierung intermolekularer β -Strukturen ist, wie die einzelnen Ketten korrekt registriert werden. So falten z.B. synthetische Peptide aus

dem Schaft des Adenovirus Ad2 in Abwesenheit des globulären N-Terminus nicht zur *triple β -spiral*, sondern bilden Fibrillen aus (van Raaij *et al.*, 1999). Die globulären, N-terminalen Domänen der Adenovirusfasern sind offenbar als Registrierungssignal notwendig; sie assemblieren auch als isolierte Fragmente zu nativen Trimeren (Bewley *et al.*, 1999; Durmort *et al.*, 2001; Papanikolopoulou *et al.*, 2004a). Die Schaftdomäne aus Ad2 faltet jedoch auch zur korrekten *triple β -spiral*, wenn sie an das *foldon*-Motiv aus T4 Fibrin fusioniert wird (Papanikolopoulou *et al.*, 2004a; Papanikolopoulou *et al.*, 2004b). Im T4 Fibrin dienen die 27 Aminosäuren des *foldons* zur korrekten Trimerisierung eines α -helikalen *coiled coils* (Tao *et al.*, 1997). Bei der Untersuchung des Faltungsweges trimerer Faserproteine muss somit auch ein Augenmerk auf die Notwendigkeit eventueller Trimerisierungssignale gerichtet werden. Es wurde vorgeschlagen, die grundlegenden Erkenntnisse über die β -Strukturen viraler Fasern und deren Stabilität für die Entwicklung stäbchenförmiger Nanobausteine zu nutzen (van Raaij *et al.*, 2001). Auch wird ein Einsatz in der Gentherapie denkbar, wenn stabile, trimere Fasern z.B. von Adenoviren mit therapeutisch wirksamen Aminosäuresequenzen fusioniert werden (Papanikolopoulou *et al.*, 2004b). Weiterhin rücken virale Faserproteine ins Zentrum des Interesses, seitdem die Bedeutung von amyloiden Erkrankungen erkannt wurde. Amyloide sind außerordentlich stabile β -Proteinstrukturen, deren Aufbau bisher im molekularen Detail noch wenig be-

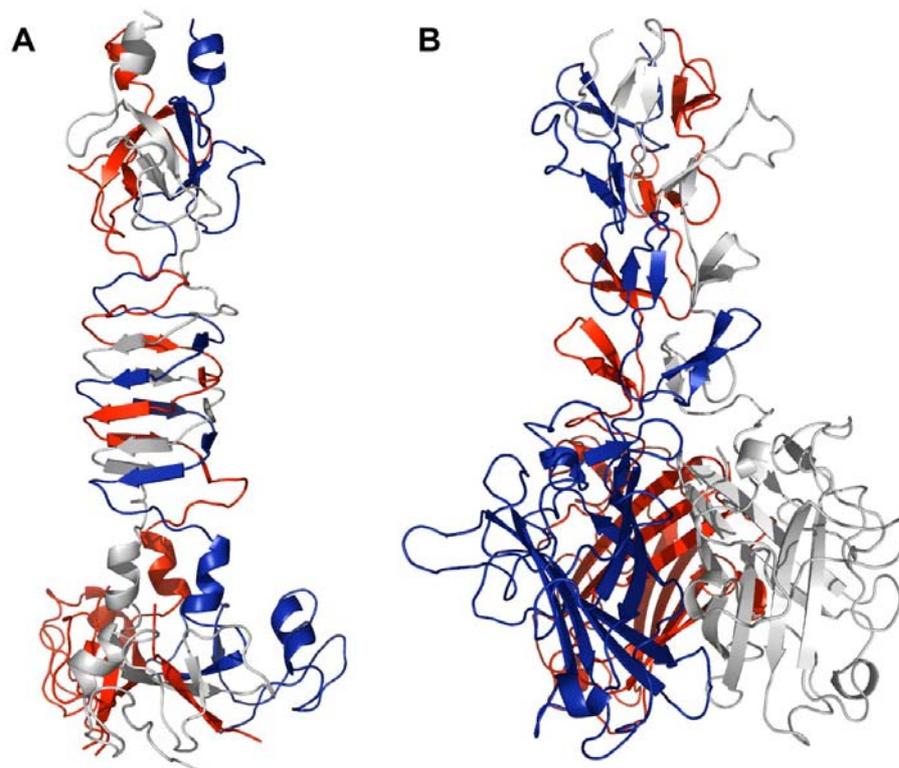


Abbildung 2.

β -Faltblatt-Supersekundärstruktur motive in trimeren viralen Faserproteinen. A. Fragment der kurzen Schwanzfaser des Bakteriophagen T4 mit *triple β -helix* (van Raaij *et al.*, 2001) (1h6w). B. Fragment der Anheftungsfaser des humanen Adenovirus Serotyp 2 mit *triple- β -spiral* (van Raaij *et al.*, 1999) (1qiu). Die Proteine sind zueinander nicht maßstabsgetreu und so dargestellt, dass der N-Terminus nach oben weist.

kannt ist (Sunde & Blake, 1998; Wetzel, 2002). Denkbar wäre, dass die neu identifizierten β -Faltungsmotive als Vorbilder zur Modellierung von Amyloidstrukturen dienen könnten (siehe auch Abschnitt 1.2.2.).

1.2. Das Motiv der parallelen β -Helix

Die Supersekundärstruktur einer parallelen β -Helix wurde zuerst im Jahr 1993 von Yoder, Keen und Journak für die Pektatlyase C (PeIC) beschrieben (Yoder *et al.*, 1993a). Dabei ist das Faltungsmotiv der parallelen β -Helix nicht mit der speziellen Konformation des membranständigen D-Peptids Gramacidin A zu verwechseln, für die schon früher der Begriff „ β -Helix“ verwendet wurde (Langs, 1988; Wallace & Ravikumar, 1988). Weiterhin unterscheidet man zwischen rechts- und linksgängigen β -Helices, seitdem Raetz und Roderick 1995 die Struktur der UDP-N-acetylglucosaminacyltransferase beschrieben haben (Raetz & Roderick, 1995). Nach der Nomenklatur von Yoder bilden in der rechtsgängigen parallelen β -Helix drei kurze β -Stränge B1, B2 und B3, die durch die *turns* T1, T2 und T3 verbunden sind, eine Windung (*coil*) aus (Abbildung 3.). Die Länge der *turns* ist für T1 und T3 variabel, T2 besteht meist aus nur zwei Aminosäuren. Die *coils* stapeln sich wiederholt übereinander, es entsteht eine rechtsgängige Helix mit drei ausgedehnten parallelen β -Faltblättern. B1 und B2 bilden darin ein antiparalleles *sandwich*, so dass ein L-förmiger Querschnitt entsteht (Yoder *et al.*, 1993b). Zusätzlich wird die β -Helix durch innen liegende Stapel gleicher Reste in äquivalenten Positionen benachbarter *coils* mit gleichem χ der Seitenkette stabilisiert. Die gesamte Domäne kann als Faltungseinheit angesehen werden, es bleibt die Frage, ob die Stapel nötig sind, um die einzelnen β -Stänge korrekt in der Helix zu registrieren (Walter, 2002). Durch die Wiederholung der *coils* kann man die β -Helix in die Klasse der *repeat*-Proteine einordnen; diese werden auch als *solenoid* Proteine bezeichnet (vom englischen Wort *solenoid* für spulenförmig) (Kobe & Kajava, 2000). Die rechtsgängige parallele β -Helix lässt sich aus der Aminosäuresequenz nicht vorhersagen, da die Länge eines einzelnen *coils* vari-

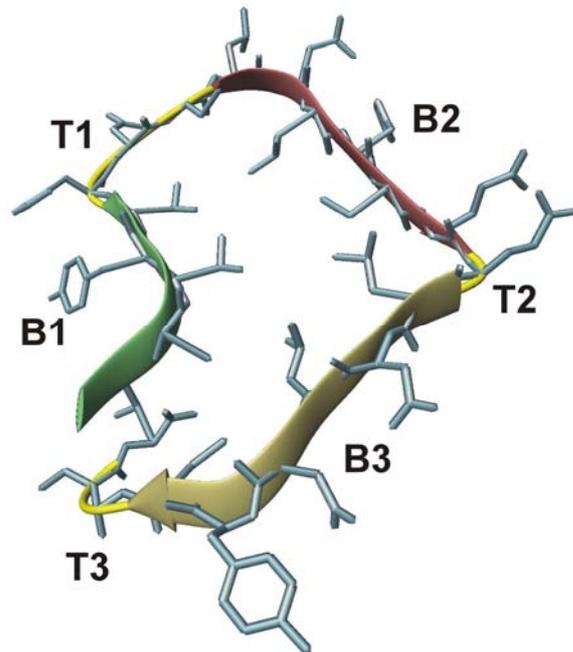


Abbildung 3. Nomenklatur eines *coils* einer parallelen rechtsgängigen β -Helix nach Yoder (Yoder *et al.*, 1993b). Als Beispiel ist eine Windung der parallelen β -Helix aus Sf6TSP gezeigt (*coil* 7, Val³⁸³-Gly⁴⁰⁵). B1, B2, B3: β -Faltblätter. T1, T2, T3: *turns*. Die Sekundärstruktur wurde mit dem Programm PROMOTIF (Hutchinson & Thornton, 1996) berechnet und die Struktur mit dem Programm MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) dargestellt.

abel ist. In die *turns* können beliebig viele Aminosäuren bis hin zu eigenen Proteindomänen inseriert sein. Bis zum Jahr 2000 waren 15 parallele, rechtsgängige β -Helices beschrieben (Jenkins & Pickersgill, 2001). Aktuell sind etwa 25 Proteine bekannt, die zu diesem Strukturmotiv falten. Fast alle Proteine mit rechtsgängigen β -Helices sind monomer, die einzige Ausnahme ist das trimere Tailspike Protein des Bakteriophagen P22 (siehe Abschnitt 1.3.1.). Alle Proteine mit parallelen β -Helices, deren Bindungspartner bekannt sind, sind Bestandteil von Enzymen, die Kohlenhydratpolymere binden und spalten. Dies sind vor allem die Pektat- und Pektinlyasen pflanzenpathogener Bakterien (Jenkins & Pickersgill, 2001), Pflanzenpollenproteine (Czerwinski *et al.*, 2005), bakterielle Polygalacturonasen (Jenkins & Pickersgill, 2001), sowie Carragenasen (Michel *et al.*, 2001) und Dextranasen (Larsson *et al.*, 2003) aus Pilzen und marinen Bakterien. Es wurde postuliert, dass in diesen Proteinen die parallele, rechtsgängige β -Helix im Laufe der Evolution als ein Strukturmotiv entstanden ist, das speziell elongierte Polysaccharidmoleküle parallel zur Helixachse binden kann (Jenkins *et al.*, 1998). Deshalb spielen diese Proteine vermutlich vor allem eine Rolle bei der Oberflächenerkennung und dem Eindringen in eine Zelle. Die β -Helix scheint dabei ein besonderes Strukturmotiv prokaryotischer Pathogene zu sein; in höheren Eukaryoten ist sie bisher nicht gefunden worden (Bradley *et al.*, 2001).

Linksgängige β -Helices unterliegen dem gleichen Bauprinzip wie rechtsgängige. Hier findet man jedoch Hexapeptid-*repeats* (Vaara, 1992). Zurzeit sind etwa 10 Proteine bekannt, die in eine linksgängige parallele β -Helix falten. Dabei entsteht durch die Wiederholung von gleichen Aminosäureresten in jedem *coil* ein regelmäßiger, dreieckiger Querschnitt der linksgängigen β -Helix. Die Proteine fungieren als Überträger von Säureresten z.B. in UDP-N-acetylglucosaminacyltransferase aus *E. coli* (Raetz & Roderick, 1995), Carboanhydrase aus *Methanosarcina thermophila* (Kisker *et al.*, 1996) oder in der Acetyltransferase aus *Pseudomonas aeruginosa* (Beaman *et al.*, 1998). Eine linksgängige β -Helix mit Pentapeptid-*repeat* findet man im Eis bindenden Protein des Fichtenschädlings *Choristoneura fumifera* (Graether *et al.*, 2000). Alle linksgängigen β -Helices sind native Trimere; Ausnahme ist die ADP-Glucosepyrophosphorylase aus Kartoffelknollen: Hier findet die Wechselwirkung zwischen zwei β -Helices über ihre Enden statt und trägt so zur Stabilität eines Dimers und zur allosterischen Regulation des Enzyms bei (Jin *et al.*, 2005).

1.2.1. Strukturvorhersage von rechtsgängigen parallelen β -Helices

Proteine mit paralleler β -Helix gehören zur Klasse der *repeat*-Proteine. Ein *coil* kann als das sich wiederholende Element angesehen werden, dabei verhindern jedoch die flexibel langen *turns* innerhalb eines *coils* eine Strukturvorhersage aus der Primärstruktur (Jenkins *et al.*, 1998; Kobe & Kajava, 2000). Bisher sind zwei Methoden zur Vorhersage der rechtsgängigen parallelen β -Helix beschrieben worden. Das alternierende Muster innen und außen liegender Seitenketten in der β -Helix wurde von Heffron und Mitarbeitern zugrunde gelegt, um ein Sequenzprofil eines idealisierten *coils* zu konstruieren (Heffron *et*

al., 1998). Nach einer Analyse von 30 *coils* aus Pektat- und Pektinlyasen konnten bestimmten Positionen Aminosäurepräferenzen zugeordnet werden. Allerdings identifiziert die Methode nur weitere Mitglieder der gleichen Proteinfamilie und erzeugt auch falsch-positive Treffer wie z.B. die Vorhersage der parallelen β -Helix für Internalin B, das zu den *leucin rich repeat* (LRR) Proteinen gehört und *repeats* aus β -Strängen und 3_{10} -Helices besitzt (Schubert *et al.*, 2001).

Das Programm BETAWRAP legt in seinem Algorithmus zugrunde, dass die Wechselbeziehungen zwischen Seitenketten in benachbarten Strängen im β -Faltblatt in globulären und β -Helix-Proteinen ähnlich sein müssen (Bradley *et al.*, 2001). Diese Präferenzen für die paarweise Packung von Aminosäuren wurden zunächst aus Strukturdatenbanken ermittelt. Die zu analysierende Aminosäuresequenz wird dann anhand von Hydrophobizitätskriterien in β -Stränge zergliedert und in *coils* gefaltet. Dabei werden die Längen der *turns* eines *coils* so variiert, dass die Seitenkettenpackung optimal ist. Mit BETAWRAP wurden aus 600 000 Proteinen ca. 2500 postuliert, die eine parallele β -Helix enthalten. Auch hier wurden jedoch als Falsch-Positive LRR-Sequenzen identifiziert. Die Analyse der Datenbank mit BETAWRAP zeigt jedoch allgemeine Tendenzen für das Vorkommen und die Funktion der β -Helix. Das Strukturmotiv kommt vor allem in humanpathogenen Toxinen, Adhäsinen und Allergenen aus Bakterien und Pilzen vor. In Proteinsequenzen aus höheren Eukaryoten wurde es dagegen nur selten postuliert.

1.2.2. *Parallele β -Helices als Modelle für amyloide Strukturen*

Die Anordnung der lang gestreckten Faltblätter parallel zur längsten Achse der Proteinmoleküle legt einen Vergleich von parallelen β -Helices mit amyloiden Strukturen nahe. Amyloide sind unlösliche, proteinogene Fasern, die bereits im 19. Jahrhundert erstmals beschrieben wurden. Sie entstehen bei der Selbstassoziation teilweise gefalteter Proteine. Als Pathogene treten sie beim Menschen bei übertragenen oder erbten Störungen im Proteinstoffwechsel auf. Normalerweise lösliche Proteine und Polypeptide werden als Fibrillen abgelagert, es resultiert Organversagen. Beispiele sind die Alzheimersche Krankheit, Parkinson, Corea Huntington oder transmissible spongiforme Enzephalopathien wie z.B. die Creutzfeldt-Jacob-Krankheit (Sunde & Blake, 1998; Wetzel, 2002). Man vermutet jedoch, dass nicht die Amyloidfibrillen selbst die cytotoxischen Agentien sind, sondern oligomere Assoziate, die während der Fibrillenbildung auftreten (Cleary *et al.*, 2005). Nicht als Krankheitserreger werden dagegen die amyloiden Hefeprioren angesehen, die nicht auf DNS-Basis vererbte Stoffwechseleffekte in der Zelle bewirken (True & Lindquist, 2000; Wickner, 1994). Amyloide und β -Faltblatt-reiche Aggregate stellen demnach wichtige alternative Faltungszustände dar und tragen zum Verständnis der Faltungsreaktion bei (Betts & King, 1999). Unabhängig von der Sequenz können sie aus Proteinen entstehen, die im nativen Zustand gemischte oder rein α -helicale bzw. reine β -Faltblatt-Sekundärstruktur haben.

Die biophysikalische Analyse von Amyloiden ist strukturell nur mit Methoden niedriger oder mittlerer Auflösung möglich. Elektronenmikroskopisch wird der Durchmesser der Fibrillen zu etwa 100 Å bestimmt, sie sind aus unterschiedlichen Anzahlen gedrehter Bündel von Protofilamenten aufgebaut. Bei Färbung mit Kongorot zeigen Amyloide grüne Doppelbrechung des polarisierten Lichts, was auf eine geordnete Molekülstruktur schließen lässt, die die Einlagerung des Diazofarbstoffs ermöglicht (Puchtler & Sweat, 1965). Die Sekundärstruktur wurde aus Röntgenbeugungsexperimenten an orientierten Fasern als *cross*- β -Typ bestimmt: Die meridionalen Reflexe parallel zur Faserachse zeigen, dass die β -Stränge im charakteristischen Abstand von 4.7 Å senkrecht zur Achse in Faltblättern angeordnet sind, die parallel zur Faserachse liegen. Die Faltblätter müssen wie in globulären Proteinen um 15-30° verdreht sein um sterische Behinderungen der Peptidgruppe mit der Seitenkette zu vermeiden. Daraus ergibt sich ein sequenzabhängiger *twist* um die Faserachse des Protofilaments. Ausgehend von diesen Beobachtungen entwickelten Sunde und Mitarbeiter das so genannte β -Faltblatt-Helix Modell für das Amyloid Val-30Met FAP mit einem *Helix-repeat* von 115 Å (Sunde & Blake, 1998). Jimenez und Mitarbeiter modellierten mithilfe Kryo-elektronenmikroskopischer Aufnahmen die *cross*- β -Struktur der SH3-Domäne von Phosphatidylinositol-3'-kinase mit flacheren Faltblättern (Jimenez *et al.*, 1999) und einem *Helix-repeat* von ca. 600 Å (Abbildung 4). Unter Berücksichtigung dieser experimentellen Erkenntnisse sind eine Reihe von Modellen für die molekulare Struktur von Amyloiden entwickelt worden (Sunde & Blake, 1998; Wetzel, 2002). Frühe Modelle postulierten lineare Assoziate aus zweiseitigen β -sandwich Bausteinen (Sunde & Blake, 1998). Festkörper-NMR-Studien am Alzheimerpeptid $A\beta_{1-40}$ (Petkova *et al.*, 2002) und Elektronenspinresonanz-Untersuchungen an α -Synuclein (Der-Sarkissian *et al.*, 2003) legen nahe, dass die β -Stränge in Amyloid vermutlich parallel angeordnet sind. Parallele Stapel der β -Stränge zickzackförmig gefalteter Peptidketten (*parallel superpleated β -structure*) sind als Modelle für das Hefepriion Ure2p (Kajava *et al.*, 2004) und die Prionform von Amylin bei Typ-2 Diabetes beschrieben worden (Kajava *et al.*, 2005). In antiparalleler Anordnung liegen dagegen β -hairpins einzelner Proteinmoleküle, die das Rückgrat der Fibrillen im so genannten *zipper spine*-Modell von β 2-Mikroglobulin-Amyloid ausbilden (Ivanova *et al.*, 2004). Auch mit Ribonuklease A kann ein solches Modell mit einem β -Faltblattrückgrat und ausgetauschten Domänen

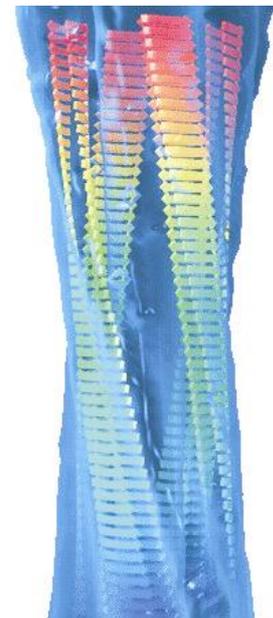


Abbildung 4. Modell einer Amyloidfaser basierend auf Elektronendichtemessungen mit Kryo-Elektronenmikroskopie an SH3-Amyloid. Abb. aus <http://www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg16r/amyloid.html>. Die Faser besteht aus 4 Protofilamenten mit *cross*- β -Struktur (Jimenez *et al.*, 1999).

(*domain swap*) konstruiert werden (Sambashivan *et al.*, 2005). β -helikale Konformation der Peptidkette im Protofilament wurde für Alzheimer A β -Protein, Transthyretin und Immunoglobulin vorgeschlagen (Lazo & Downing, 1998). Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von 2D-Kristallen von Abschnitten des Prionproteins PrP^{Sc} wurden für die Amyloidstruktur zwei Modelle mit links- und rechtsgängiger β -Helix entwickelt (Wille *et al.*, 2002). Für poly-L-Glutamin wurde postuliert, dass die Polypeptidkette mit β -Konformation eine wassergefüllte Helix mit 20 Resten/*turn* ausbildet (Perutz *et al.*, 2002). Als ein ähnliches β -helikales „Nano-Rohr“ wurden die Hefepriionen von Sup35 beschrieben (Kishimoto *et al.*, 2004). Mit Hilfe von *threading* wurden außerdem Amyloidmodelle für A β -Amyloidfibrillen (Guo *et al.*, 2004) und einen Abschnitt des Prionproteins PrP^{Sc} (Govaerts *et al.*, 2004) entwickelt, die linksgängige parallele β -Helices als Template verwenden.

1.3. Das Modellsystem des Tailspike Proteins des Bakteriophagen P22

Der *Salmonella* Phage P22 wurde 1952 entdeckt (Zinder & Lederberg, 1952b; Zinder & Lederberg, 1952a) (Abbildung 10). Er gehört zur Morphologiekategorie der *Podoviridae* und bindet bis zu sechs Tailspike Proteine an die Basisplatte (Israel *et al.*, 1967). Mindestens drei TSP sind notwendig, um den Phagen infektiös zu machen (Israel, 1978). Sie binden und spalten die repetitive Kohlenhydratstruktur des Zelloberflächenrezeptors von P22, das *S. enterica* O-Antigen. Das Tailspike Protein des Bakteriophagen P22 wird seit ca. 20 Jahren biophysikalisch und strukturell untersucht und ist bis heute Gegenstand der Forschung zu Kohlenhydratbindung und für Faltungs- und Assemblierungsstudien (Betts & King, 1999; Seckler, 1998).

1.3.1. Struktur und Faltungsweg von P22TSP

Das Tailspike Protein von P22 hat 666 Aminosäuren und eine Molekularmasse von 72 kD. Nativ liegt es als Homotrimer vor (Goldenberg & King, 1981; Seckler *et al.*, 1989). Das Protein ist proteaseresistent und thermostabil bis ca. 80 °C, bei Raumtemperatur bleibt es auch in Gegenwart von 2 % SDS nativ. Mittels limitierter Proteolyse konnte die N-terminale Kopfbindedomäne abgespalten werden, so dass ein C-terminales Fragment (P22TSP Δ N) der Kristallisation zugänglich wurde. Die Struktur von P22TSP Δ N (Reste 109-666) von P22TSP wurde 1994 von Steinbacher *et al.* mit Hilfe von Schweratomderivaten ermittelt (Steinbacher *et al.*, 1994), eine hoch aufgelöste native Struktur wurde bis 1.56 Å erhalten (Steinbacher *et al.*, 1997). Getrennt davon wurde die Struktur der N-terminalen Domäne (Reste 1-124) ebenfalls über Schweratomderivate ermittelt (Steinbacher *et al.*, 1997) (Abbildung 5). Da die beiden Domänen flexibel miteinander verbunden sind, können mit dem vollständigen Protein keine dreidimensionalen, streuenden Kristalle erhalten werden (Miller *et al.*, 1998b).

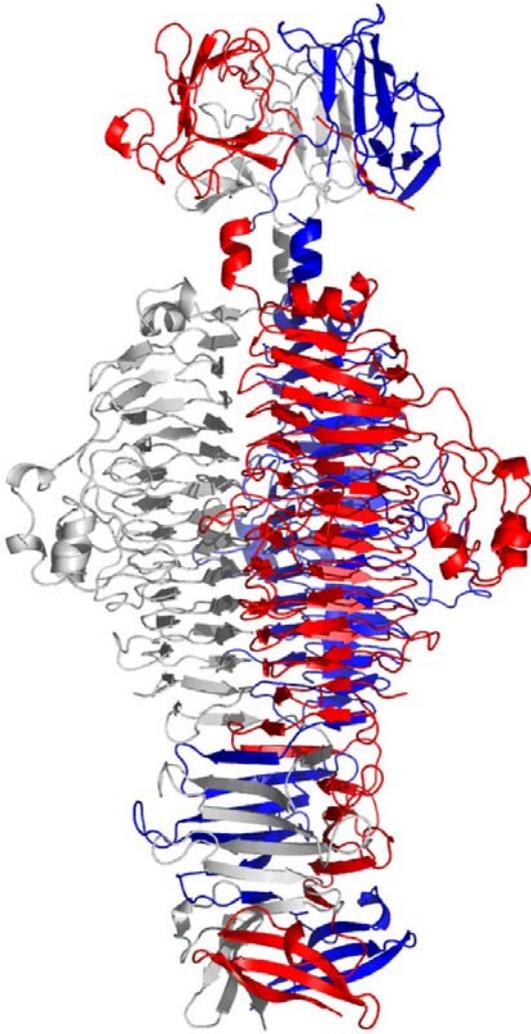


Abbildung 5.

Dreidimensionale Struktur des Tailspike Proteins des Salmonellaphagen P22 (Steinbacher *et al.*, 1997). Der N-Terminus des Proteins zeigt in der Abbildung nach oben. Die beiden unabhängigen Strukturen der kuppelförmigen, N-terminalen Domäne (1lkt) und der C-terminalen Domäne (1tyv) sind übereinander dargestellt, ohne dass Kenntnisse über einen flexiblen *linker* zwischen den beiden Domänen vorliegen. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (DeLano, 2002).

Die N-terminale Domäne von P22TSP ist für die Bindung des Proteins an die Portalstruktur des Phagenkapsids verantwortlich (Berget & Poteete, 1980; Maurides *et al.*, 1990). Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass vermutlich über das *interface* zwischen zwei Kopfbindingdomänen des Tailspikes die Proteine gp4 und gp12 aus der Portalstruktur gebunden werden (Tang *et al.*, 2005). Die N-terminale Domäne ist aus zwei β -Faltblättern aufgebaut, die im Trimer eine ca. 30 Å hohe, kuppelförmige Struktur von ca. 55 Å Durchmesser ausbilden (Steinbacher *et al.*, 1997). Für die C-terminalen Reste 109-124 ist keine Elektronendichte sichtbar; dies spricht für ihre Rolle als flexible *linker* zwischen Kopfbindingdomäne und β -Helix-Domäne. In der kryoelektronenmikroskopischen Portalstruktur des Phagen P22 ist jedoch erkennbar, dass die Tailspike Proteine mit Hilfe des *linkers* vermutlich um 20 ° in sich gekippt sind, wenn sie an den Phagen binden (Tang *et al.*, 2005). Die C-terminale Domäne von P22TSP faltet in eine parallele, rechtsgängige β -Helix mit dreizehn Windungen (Reste 143-540). Dabei sind ca. 60 Reste (190-250) eines T3 *turns* zu einer eigenen Subdomäne gefaltet. Auf der lösungsmittel-exponierten Seite befindet sich die Substratbindestelle (siehe Abschnitt

1.3.2.). Im trimeren Protein werden die Peptidketten anschließend in einer Windung einer *triple- β -helix* miteinander verwunden, bilden dann ein *triple- β -Prisma* und verwinden sich erneut, bevor sie drei antiparallele β -Faltblätter ausbilden. Die hohe Stabilität des trimeren Tailspike Proteins wurde besonders auf die Verwindung der Peptidketten am C-Terminus zurückgeführt (Kreisberg *et al.*, 2002).

Der Faltungsweg von P22TSP ist eingehend charakterisiert worden und Gegenstand aktueller Forschung. Als großes, oligomeres und langsam faltendes Protein könnte

sich P22TSP als Modellsystem für die Faltung und Assemblierung großer β -Strukturen, z.B. von Amyloiden, eignen. Der intrazelluläre Faltungsweg wurde zuerst *in vivo* untersucht (Goldenberg *et al.*, 1982), später konnte gezeigt werden, dass dieser mit dem *in vitro* Faltungsweg vergleichbar ist (Fuchs *et al.*, 1991; Seckler *et al.*, 1989) (Abbildung 6): Die unstrukturierte Spezies (Halbwertszeit 7 min) faltet über wenigstens ein monomeres Intermediat (Halbwertszeit ca. 30 min) zum Protrimer (Benton *et al.*, 2002) (Halbwertszeit ca. 10 h; alle Angaben bei 10 °C), das im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Trimerreifung zum SDS-resistenten, nativen Protein faltet (Danner *et al.*, 1993; Danner & Seckler, 1993; Mitraki *et al.*, 1993). In den zur Messung zur Verfügung stehenden Zeitfenstern kann die Bildung monomerer Intermediate beim manuellen Mischen spektroskopisch beobachtet werden. Das Protrimer kann in der Größenausschlusschromatographie oder Nativgelelektrophorese analysiert werden und als nicht SDS-resistente Spezies in der SDS-Gelelektrophorese vom nativen Protein unterschieden werden. Der modulare Aufbau des Proteins erlaubte es, die Faltung an einzelnen Domänen zu untersuchen. Nach Abspaltung des N-Terminus wurde für P22TSP ΔN der gleiche Faltungsweg wie beim Wildtyp gefunden, der vornehmlich durch Faltung und Assemblierung von β -Helix- und C-terminaler Domäne dominiert wird (Danner *et al.*, 1993). Abspaltung des N- und C-Terminus führte zum Konstrukt Bhx, das nur die β -Helix enthält, die reversibel faltet und bei niedriger Konzentration monomer vorliegt (Miller *et al.*, 1998a). Weiterhin wurden gegen das native und das denaturierte Tailspike Protein monoklonale Antikörper hergestellt und damit die Ausbildung von Epitopen während der Faltung von P22TSP *in vitro* und *in vivo* am Ribosom untersucht (Friguet *et al.*, 1990; Friguet *et al.*, 1994; Jain *et al.*, 2005). Für P22TSP existieren außerdem eine Reihe von *temperature-sensitive for folding* (tsf) Faltungsmutanten. Sie befinden sich ausschließlich in der β -Helix-Domäne und verringern bei hohen Temperaturen die Faltungsausbeute. Im nativen Zustand sind diese Mutanten weniger stabil als das native Protein (Beissinger *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1998b; Schuler & Seckler, 1998). Auf dem Faltungsweg destabilisieren sie ein frühes *on-pathway* Intermediat zugunsten aggregationsempfindlicher Spezies, was zu Ausbeuteverlusten führt (Danner & Seckler, 1993). Hier wirken *suppressor* (su) Mutanten kompensatorisch. Kontroversen bezüglich des Faltungswegs von P22TSP sind grundsätzlich nicht ausgeräumt, insbesondere ob *on pathway* Intermediate bereits nativ strukturiert vorliegen, wie dies

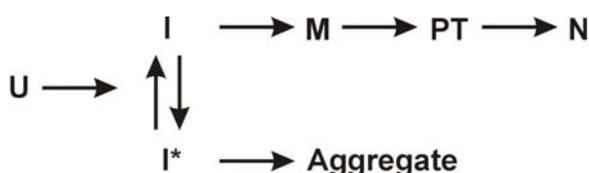


Abbildung 6.

Schematische Darstellung des Faltungsweges von P22TSP nach (Danner & Seckler, 1993). U, unstrukturierte Spezies. I, I*, Intermediate. M, Monomer. PT, Protrimer. N, nativ gefaltetes Protein.

durch die Arbeiten mit tsf-Mutanten nahe gelegt wurde, oder ob nicht-native Wechselwirkungen (*foldons*) produktiv sind. Hier entstand die Hypothese, dass sich im nicht-disulfidverbrückten P22TSP Disulfidbrücken auf dem Faltungsweg bilden könnten (Robinson & King, 1997). Neue Arbeiten am zu

P22TSP sequenzhomologen Det7TSP, der Cys⁶¹³ und Cys⁶³⁵ nicht enthält, aber ähnlich wie P22TSP faltet, widerlegen diese Vermutung (Fiedler, 2005).

1.3.2. Substratbindestelle und Spezifität von P22TSP

Das Tailspike Protein des Bakteriophagen P22 erkennt und spaltet das O-Antigen von Salmonellen der Serotypen A, B und D₁ (Baxa *et al.*, 1996). Die repetitive biologische Einheit des O-Antigens besteht aus dem Trisaccharid α -D-Manp-(1→4)- α -L-Rhap-(1→3)- α -D-Galp-(1→4). Ein 3,6-Dideoxyhexosesubstituent am C3 von Man variiert je nach Spezies. In *S. Typhimurium* findet man Abequose (Serotyp B), in *S. Paratyphi* Paratose (Serotyp A) und in *S. Enteritidis* und *S. Typhi* 253 Ty Tyvelose (Serotyp D₁) (Kauffman, 1966; Luderitz *et al.*, 1966). *S. Typhi* 253 Ty trägt zusätzlich eine Glukose als Formvariation am C4 von Gal (Weintraub *et al.*, 1988). Als Endorhamnosidase spaltet P22TSP die glykosidische Bindung im Rhamnopyranosid der O-Antigen-Hauptkette und erzeugt als Hauptprodukt ein Oktasaccharid (Eriksson *et al.*, 1979). Die Bindungsfurche für die Oligosaccharidsubstrate wurde röntgenkristallographisch nach *soaking* Experimenten von P22TSP Δ N-Kristallen mit Okta- oder Dekasacchariden identifiziert (Steinbacher *et al.*, 1996). Sie befindet sich zwischen den *turns* der Windungen 5, 7 und 8 auf der dem Lösungsmittel zugewandten Seite der β -Helix (Abbildung 7). Dabei haben die unterschiedlichen Dideoxyhexoseligan den alternative Interaktionsmöglichkeiten in der Bindestelle. Dieser *wobbling* Mechanismus der Bindung macht vermutlich größere Wirtsvariationen möglich (Steinbacher *et al.*, 1996). Die Säurereste Asp³⁹², Asp³⁹⁵ und Glu³⁵⁹ bilden das aktive Zentrum, ihre Säure-

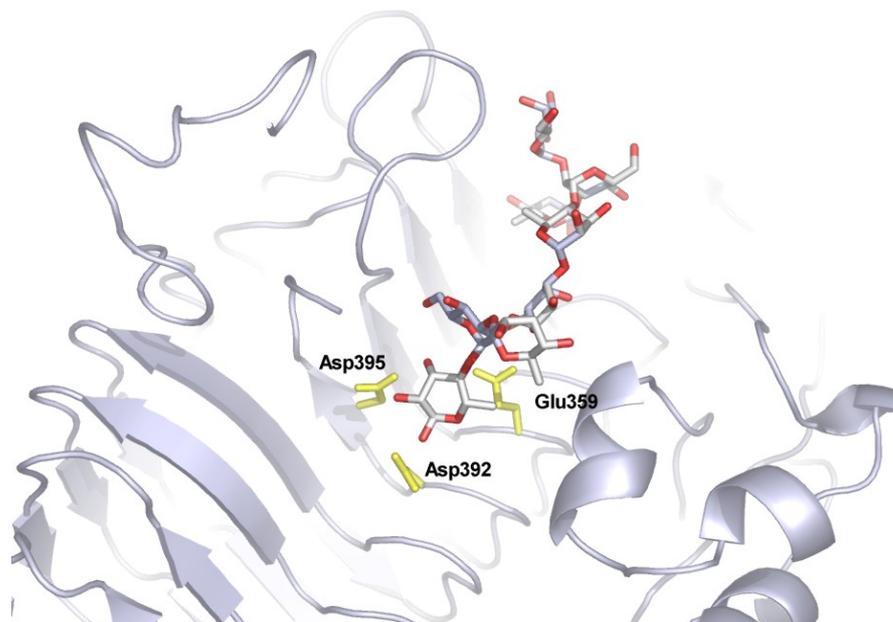


Abbildung 7.

Aktives Zentrum von P22TSP (Steinbacher *et al.*, 1996). Blick entlang der Bindungsfurche auf der lösungsmittlexponierten Seite eines Monomers vom C- in Richtung N-Terminus. Die drei katalytisch aktiven Reste Glu359, Asp392 und Asp395 sind in gelb dargestellt. Oberhalb bindet ein Oktasaccharid des LPS von *S. enteritidis*. Die Zeichnung wurde mit PyMOL aus den pdb-Koordinaten 1tyu erstellt (DeLano, 2002).

reamidmutanten zeigen bei physiologischer Temperatur nur 1/10 000 (E359Q), 1/25 000 (D395N) bzw. 1/30 000 (D392N) des Umsatzes des WT (Baxa *et al.*, 1996). Die Lage der katalytischen Reste lässt jedoch keinen eindeutigen Schluss zugunsten eines invertierenden oder konfigurationserhaltenden Reaktionsmechanismus zu (Davies & Henrissat, 1995; Steinbacher *et al.*, 1996; Steinbacher *et al.*, 1997).

Die Bindung von definierten Oligosacchariden an P22TSP wurde eingehend biophysikalisch charakterisiert. Die Enzymkinetik wurde mit fluoreszenzmarkierten Zuckern untersucht (Baxa *et al.*, 1996). Bindung von Oligosacchariden an P22TSP ist messbar über einen Fluoreszenzquench zweier Tryptophanreste in der Bindestelle oder mit kalorimetrischen Methoden (Baxa *et al.*, 2001; Baxa *et al.*, 1996). Bei 37 °C werden nur 2 Bindungen pro Minute gespalten. Dagegen sind die Gleichgewichte der Bindung von Edukt und Produkt schnell im Vergleich zur Hydrolyserate. Die Bindungsaffinität ist hoch, pro Bindestelle beträgt die freie Enthalpie der Bindung $\Delta G^{\circ}_{\text{bind}}$ ca. -30 kJ/mol, d.h. bei 3 Bindestellen bindet der Phage mehr oder weniger irreversibel an die Wirtszelle (Baxa *et al.*, 1996). Die Interaktionsfläche zwischen Protein und Kohlenhydrat erstreckt sich über zwei repetitive Einheiten. Bei der Bindung werden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Zucker und Protein ausgebildet. Die Reaktion ist enthalpisch getrieben und macht keine strukturelle Umorganisation bei Protein und Saccharid erforderlich (Baxa *et al.*, 2001).

Mit diesen Ergebnissen wurde die Funktion des Tailspike Proteins für den Phagen diskutiert. Vermutlich hat es nicht die Aufgabe eines Bohrers, der ein Loch im Polysaccharid erzeugen muss, denn im Vergleich zur langsamen Hydrolyserate dauert die gesamte Infektion mit dem Phagen nur wenige Sekunden bis Minuten. Bindung und Dissoziation sind andererseits so schnell, dass eine laterale Bewegung zu einem sekundären Rezeptor möglich wäre (Baxa *et al.*, 2001; Baxa *et al.*, 1996). Die Endorhamnosidaseaktivität könnte aber auch dazu dienen, neu synthetisierte Phagen von Zellwandbruchstücken der Wirtszelle zu befreien (Liu *et al.*, 1995). Für den Infektionsprozeß ist sie jedoch nötig, wie Versuche mit inaktiven Mutanten von P22TSP gezeigt haben.

1.4. Neue Tailspike Proteine aus Bakteriophagen mit rechteckigen, oligomeren β -Helices

Bei Bakteriophagen mit ähnlicher Morphologie nimmt man eine evolutionäre Verbindung an (Ackermann, 2001). In den *Podoviridae* P22 und Sf6 kodieren die morphogenetischen Gene für Proteine in ähnlichen Größen und Mengen (Casjens *et al.*, 2004). Ein Großteil der Informationen über vollständige Genome und die Verwandtschaftsverhältnisse von Bakteriophagen wird jedoch erst seit einigen Jahren durch beschleunigte und verbesserte Sequenzieretechniken zugänglich (Casjens, 2003). Entsprechend war das Tailspike Protein des *Salmonella*-Phagen P22 lange Zeit das einzige charakterisierte Adhäsins der *Podoviridae* (siehe Abschnitt 1.3.1.). Der Vergleich mit weiteren Tailspike Proteinen

von Phagen dieses Morphologietyps wurde erst durch die Sequenzierung der Genome möglich (Casjens *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2001; Pedulla *et al.*, 2003).

1.4.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen

Bei einer Suche mit dem Programm BLAST gegen die Aminosäuresequenz von P22TSP in der Datenbank UniProt (Swiss-Prot und TrEMBL) findet man unter den zehn am höchsten bewerteten Treffern acht Tailspike Proteine aus Bakteriophagen (Stand September 2005; siehe Tabelle 1) (Altschul *et al.*, 1997). Neben Sequenzen aus *Salmonella*-Prophagen mit Sequenzübereinstimmungen von 60-100% findet man vier Tailspike Proteine mit hoher Sequenzidentität in den ersten 114 Aminosäuren, die in P22TSP für die Kopfbindung an das Kapsid verantwortlich sind (siehe Abschnitt 1.3.) (Abbildung 8). Im C-terminalen Teil sind keine Aminosäureübereinstimmungen mehr detektierbar (kompletter Vergleich siehe Anhang A). Dieser Befund führte zunächst zur biochemischen Untersuchung des Tailspike Proteins des *Shigella*-Phagen Sf6 (Chua *et al.*, 1999; Freiberg *et al.*, 2003), um zu klären, ob Tailspike Proteine trotz fehlender Sequenzidentität im C-Terminus wie P22TSP zu einer rechtsgängigen parallelen β -Helix falten. Auf gleiche Weise wurde in dieser Arbeit das Tailspike Protein des Coliphagen HK620 analysiert (siehe Abschnitt 1.4.3.). Das Tailspike Protein APSE-1 aus dem Phagen eines Blattlausendosymbionten ist stark C-terminal verkürzt und spielt bei der Infektion vermutlich keine Rolle mehr (van der Wilk *et al.*, 1999). Im kürzlich sequenzierten Genom von *S. enterica* Choleraesuis wurde ebenfalls ein Protein gefunden, das den gleichen N-Terminus und eine ähnliche Länge wie die übrigen Tailspike Proteine aufweist (Chiu *et al.*, 2005). Es könnte zu einem noch nicht identifizierten Prophagengenom gehören. Wegen ihres modularen Aufbaus aus einer Kopfbindedomäne und einer Rezeptorerkennungsdomäne gehören die Tailspike Proteine zu den Kompositproteinen (Clark *et al.*, 2001). Evolutionär sind sie vermutlich durch Rekombinationsereignisse an den Domänengrenzen entstanden, bei denen vor allem Protein-Interaktionsdomänen ausgetauscht werden.

		10	20	30	40	50			
P22TSP	1	MTD-	ITANVVVSNRP	IFTESRSFKAVANGKI	YIGQIDTDPVNPANQ	IPVYIENEDGSHVQ	60		
S_Chol_hyp	1	MSD-	ITANVVVSNRP	IFTESRSFKAVADGKI	YIGKIDTDPVNPANQ	IPVYIENEDGSHVQ	60		
Sf6TSP	1	MTD-	ITNVVIGMPSQLFT	MARSFKAVANGKI	YIGKIDTDPVNPENQ	IQVYVENEDGSHVP	60		
HK620TSP	1	MTDS	INANVVVSMPSQLFT	MARSFKAVANGKI	YIGKIDTDPVNPENR	IQVYVENEDGSHVP	61		
APSE-1TSP	1	MSK-	IIPNIVVSMPTQLFT	LRRKFAQCSNGKI	YIGKSNLDP	TIPTNQIQVYIENEDGSTVP	60		
		70	80	90	100	110			
P22TSP	61	ITQPLI	INAAGKI	VYNGQLVKI	VTVQGHSM	AYDANGSQVDY	I	ANVLKYDPDQY-	114
S_Chol_hyp	61	IAQPLI	INSAGKI	VYNGQLVKI	VTVQGHSM	AYDAYGSQVDY	I	ANVLKYDPDQFR	115
Sf6TSP	61	ASQP	IVINAAGYP	VYNGQIVK	FVTEQGHSM	AVYDAYGSQQF	Y	FQNVLYKYPDQF-	114
HK620TSP	62	VSQP	IINAAGYP	VYNGQIAK	FVTVQGHSM	AVYDAYGAQQF	Y	FPNVLYKYPDQFR	116
APSE-1TSP	61	VAQP	IMINHAGFP	VYNGQIAK	FVTVES	HSM	AVYDS	GAQQFYFADILKYGFNR--	113

Abbildung 8.

ClustalW-Sequenzvergleich der ersten 114 Aminosäuren und putativen Kopfbindedomänen der Tailspike Proteine der Bakteriophagen P22, Sf6, HK620 und APSE-1 sowie eines hypothetischen Proteins aus *Salmonella* Choleraesuis (S_chol_hyp). Darstellung mit dem Programm JalView (Clamp *et al.*, 2004). Der Vergleich der kompletten Sequenzen befindet sich im Anhang A.

Dies wurde auch beim Rekombinationsprotein Erf des Phagen HK97 beobachtet (Juhala *et al.*, 2000). Dabei sind Domänen mit stark homologen Sequenzbereichen die Vermittler von Protein-Protein-Kontakten.

1.4.2. Das Tailspike Protein des Bakteriophagen Sf6

Der Bakteriophage Sf6 benötigt sein Tailspike Protein zur Erkennung seines gram-negativen Wirtsbakteriums *Shigella flexneri*. Wie HK620 und P22 gehört er zur Morphologiekategorie *Podoviridae* mit doppelsträngiger DNS. Er ist der kleinste der drei Phagen, der Durchmesser seines Kopfes beträgt 53 nm (Abbildung 9). Der nicht-kontraktile, kurze Schwanz trägt die sechs Tailspike Proteine (Lindberg *et al.*, 1978). Bereits vor der kompletten Sequenzierung des Genoms von Sf6 wurde sein Tailspike Protein durch Southern-Hybridisierung mit dem Gen für P22TSP identifiziert und kloniert (Chua *et al.*, 1999), dies war wegen der hohen Sequenzhomologie der N-Termini möglich (siehe Abschnitt 1.4.1.).

Tabelle 1. Proteinhomologe von P22TSP mittels Suche mit BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Protein	Swiss-Prot-Id	Aminosäuren	Sequenzidentität mit P22TSP ¹		Referenz
			aa 1-667	aa 1-114	
Tailspike Protein Phage P22, <i>S. enterica</i> Typhimurium	Q77D82	667	100%	100%	(Pedulla <i>et al.</i> , 2003)
Tailspike Protein Prophage ST104, <i>S. Typhimurium</i>	Q76H47	667	98.7%	100%	(Tanaka <i>et al.</i> , 2004)
Tailspike Protein Prophage ST64T, <i>S. Typhimurium</i>	Q8H9G0	667	98.5%	100%	(Mmolawa <i>et al.</i> , 2003)
Tailspike Protein Phage KS7, <i>S. Typhimurium</i>	Q5IGW2	442	83.1%	-	Übereinstimmung ab Ala222.
Tailspike Protein Phage SP6, <i>S. Typhimurium</i>	Q8SCG9	550	58.0%	-	Übereinstimmung ab Ser114. (Dobbins <i>et al.</i> , 2004)
Hypothetisches Protein aus <i>S. Choleraesuis</i> (Prophage?)	Q57SN8	586	35.5%	93.9%	(Chiu <i>et al.</i> , 2005)
Tailspike Protein Phage Sf6, <i>Shigella flexneri</i>	Q9XJP3	623	24.8%	72.8%	(Casjens <i>et al.</i> , 2004)
Tailspike Protein Phage HK620, <i>Escherichia Coli H</i>	Q9AYY6	710	25.4%	73.9%	(Clark <i>et al.</i> , 2001)
Tailspike Protein Phage APSE-1, Blattlausendosymbiont (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)	Q9T1R2	339	29.7%	57.2%	(van der Wilk <i>et al.</i> , 1999)

¹Berechnet mit dem Programm JalView (Clamp *et al.*, 2004). Sequenzen mit hoher Homologie im N-Terminus und geringer Homologie im C-Terminus sind grau unterlegt.

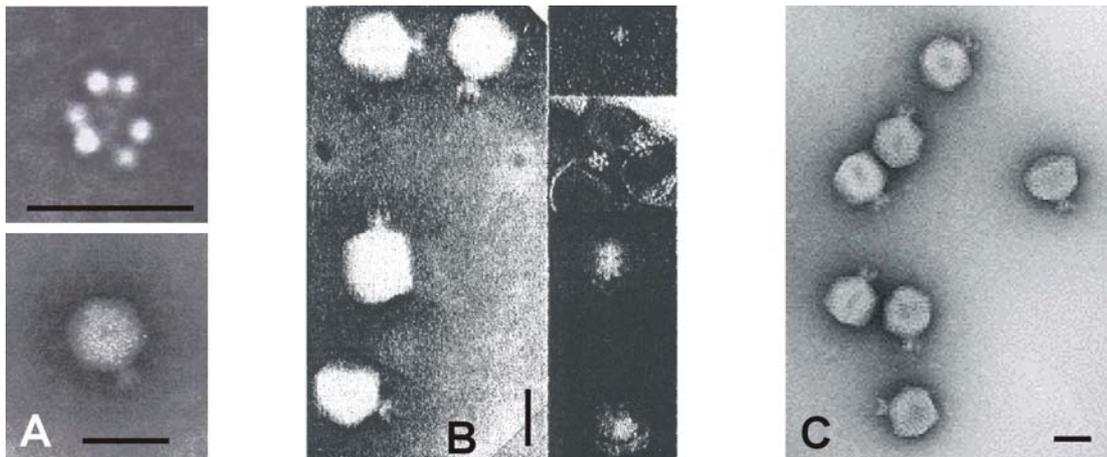


Abbildung 9.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Podoviridae*. A. Shigellaphage Sf6, Durchmesser 53 nm. Oben: Blick auf die Basisplatte mit sechs Tailspike Proteinen (aus (Lindberg *et al.*, 1978)). B. *Salmonella*-Phage P22, Durchmesser 50 nm (aus (Israel *et al.*, 1967)). C. Coliphage HK620, Durchmesser 59 nm (aus (Dhillon *et al.*, 1998)). Die Länge der Balken entspricht 50 nm.

Das Protein wurde gereinigt und biochemisch charakterisiert (Freiberg *et al.*, 2003). Die Sekundärstruktursignale im CD und im FT-IR zeigen wie bei P22TSP einen hohen Gehalt an β -Faltblattstruktur. Genau wie P22TSP ist Sf6TSP ein hitze- und proteaseresistentes Trimer, das sich bei Raumtemperatur nicht mit SDS denaturieren lässt.

Sf6TSP bindet spezifisch das O-Antigen des äußeren Lipopolysaccharids (LPS) (siehe Abschnitt 1.1.2.). Die repetitive biologische Einheit des O-Antigens besteht aus dem Tetrasaccharid α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc β -(1 \rightarrow 2) (Carlin *et al.*, 1984). Unverzweigt entspricht dieses Tetrasaccharid dem Serotypen Y. Weitere Serotypen entstehen durch zusätzliche Glukosereste oder O-Acetylierungen der Sei-

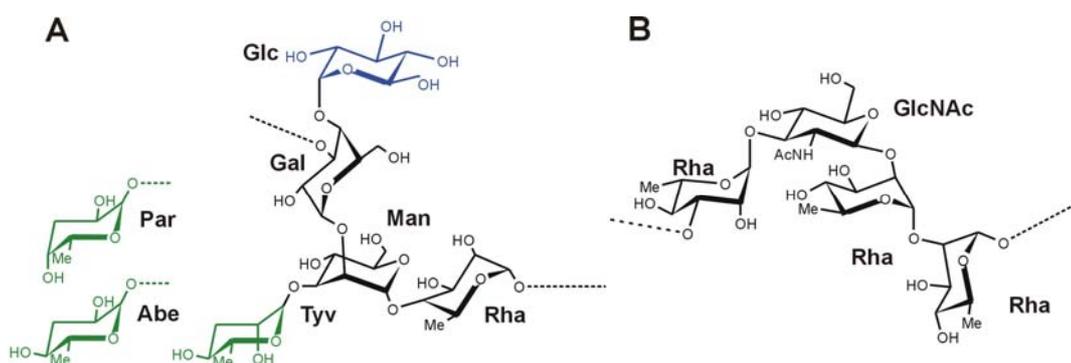


Abbildung 10.

Erkennungsstrukturen der O-Antigen-*repeats* auf Wirtsbakterien von Bakteriophagen der Klasse *Podoviridae* (die *repeats* sind so dargestellt wie sie vom Phagen erzeugt werden). A. Der *Salmonella*-Phage P22 spaltet das Rhamnopyranosid der O-Antigen-Hauptkette. Die Dideoxyhexoseverzweigung (grün dargestellt) am C3 von Mannose tritt je nach Wirt als Tyvelose bei *S. Enteritidis* und *S. Typhi* 253Ty, sowie als Abequose bei *S. Typhimurium* und als Paratose bei *S. Paratyphi* auf. Glukosereste als Formvariation (blau dargestellt) findet man bei *S. Typhi* 253Ty. B. Der *Shigella*-Phage Sf6 spaltet die α -1,3-glykosidische Bindung zwischen zwei Rhamnoseeinheiten des unverzweigten O-Antigens von *Shigella flexneri* Serotyp Y.

tenkette (Allison & Verma, 2000). Sf6TSP ist wie P22TSP eine Endorhamnosidase. Es spaltet die α -1,3-glykosidische Bindung zwischen zwei Rhamnoseeinheiten, als Hauptprodukt entstehen dabei wie bei P22TSP Oktasaccharide (Lindberg *et al.*, 1978) (Abbildung 10). Fluoreszenzmarkierte Dodekasaccharide werden von Sf6TSP etwa hundertmal schneller gespalten als die entsprechenden Dekasaccharide (Freiberg *et al.*, 2003). In Analogie zur gut untersuchten Bindung und Enzymkinetik an P22TSP (Baxa *et al.*, 1996) führte dies zu der Hypothese einer ähnlichen Architektur der Bindestelle in Sf6TSP.

1.4.3. Das Tailspike Protein des Bakteriophagen HK620

Auf der Suche nach P22-ähnlichen generell transduzierenden Phagen bei *E. coli* beschrieben A.J. Clark und Mitarbeiter 1999 erstmals den temperenten Coliphagen HK620 (Dhillon *et al.*, 1998). Er wurde auf dem bisher nicht charakterisierten Stamm *E. coli* H TD2158 isoliert (Abbildung 9). H steht dabei nicht für das flagellare Antigen sondern für „Hongkong“, da *E. coli* H aus einer dortigen Abwasserprobe stammt. Der Phage HK620 wurde sequenziert und seine Verwandtschaft zu P22, APSE-1 und Sf6 diskutiert (Casjens *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2001). Sein mosaikartiges Genom enthält besonders viele Anteile des Genoms von Sf6. Das Gen des Tailspike Proteins von HK620 ist ein zusammengesetztes Mosaik aus der in P22, APSE-1 und Sf6 homologen Kopfbindedomäne und einem nicht sequenzhomologen, C-terminalen Teil. Expression, Reinigung und Charakterisierung des Proteins sind Teil dieser Arbeit.

1.5. Aufgabenstellung

Für nicht die nicht sequenzhomologen, aber evolutionär verwandten Tailspike Proteine aus Bakteriophagen der Morphologiekategorie *Podoviridae* werden parallele β -Helices als Supersekundärstrukturmotiv postuliert. In dieser Arbeit sollten deshalb die Tailspike Proteine der Bakteriophagen HK620 und Sf6 strukturell und biochemisch charakterisiert und mit dem gut untersuchten Tailspike Protein des Phagen P22 verglichen werden. HK620TSP wurde dazu kloniert, gereinigt und hinsichtlich Stabilität und Oligomerisierungsgrad untersucht. Für Sf6TSP wurde in vorausgehenden Arbeiten aufgrund der biochemischen und spektroskopischen Ähnlichkeit zu P22TSP eine oligomere, rechtsgängige parallele β -Helix postuliert (Freiberg *et al.*, 2003). Ob die nicht zu P22TSP sequenzhomologen Abschnitte von Sf6TSP und HK620TSP ebenfalls zu diesem Strukturmotiv falten, sollte mit Röntgenkristallstrukturanalyse geklärt werden. Tailspike Proteine sind Endoglykosidasen. Die Lage ihrer Substratbindestellen sollte untersucht und verglichen werden. Für HK620TSP war dafür zunächst die Struktur seines Kohlenhydratrezeptors und seine enzymatische Spezifität aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Agarose (ultra pure)	Biozym, Hameln
Ammoniumperoxydisulfat	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar, -Trypton, -Yeast Extract	Difco (Detroit, USA)
Glutaraldehyd, 25 % in Wasser	Serva, Heidelberg
Guanidinhydrochlorid (<i>ultra pure</i>)	ICN Biomedicals (Ohio, USA)
Harnstoff (<i>ultra pure</i>)	ICN Biomedicals (Ohio, USA)
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Oligomannane	Megazyme International, Bray, Ireland
Serva Blau R250	Serva, Heidelberg
Seleno-L-Methionin p.a.	Sigma (St. Louis, USA)
Tween20	Calbiochem (San Diego, USA)
Desoxynukleotidtriphosphate	GE Healthcare, Freiburg

Alle nicht im Einzelnen aufgeführten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.a. und wurden von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (St. Louis, USA) bezogen. Zur Herstellung aller Lösungen wurde mit einer Millipore-Anlage gereinigtes Wasser verwendet.

2.1.2. Standards und Kits

Crystal Screen™	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Crystal Screen2™	Hampton Research, (Aliso Viejo, CA, USA)
DNA-Längenstandard λ /BstEII	New England Biolabs, Schwalbach
Protein-Molekularmassen-Marker	Sigma (St. Louis USA)
QIAprep spin® Miniprep Kit (50)	Qiagen, Hildesheim
HiSpeed® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hildesheim
QIAquick® u. Gel Extraction Kit (50)	Qiagen, Hildesheim
<i>Strep</i> -tag Starter Kit	IBA, Göttingen

2.1.3. Enzyme und Proteine

Trypsin <i>sequencing grade</i>	Roche, Mannheim
Trypsin	Sigma, (St. Louis, USA)
Chymotrypsin	Serva, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
VentPolymerase	New England Biolabs, Schwalbach
<i>PfuTurbo</i> ®DNA Polymerase	Stratagene, (La Jolla, CA, USA)
Dpn I	Stratagene, (La Jolla, CA, USA)
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Klenow-Fragment	Promega, (Madison, WI, USA)

2.1.4. Plasmide, Oligodesoxynukleotide und Oligosaccharide

2.1.4.1. Vektoren:

pET-Vektoren 11a, 11d, 21a	Novagen über Merck, Darmstadt
pProExHTb	Invitrogen, Karlsruhe
pT7-BsPel	Monika Walter (Walter, 2002)

Der Vektor pSf6orf1 mit dem Gen für Sf6TSP in pGEMT (Promega, Mannheim) (Chua *et al.*, 1999) wurde freundlicherweise von R. Morona zur Verfügung gestellt. Der Vektor pSf6ΔN mit dem Gen für das N-terminal verkürzte Sf6TSP in pET 11a (Novagen, über Merck, Darmstadt) wurde von Alexander Freiberg hergestellt (Freiberg *et al.*, 2003). Der Vektor pHk9s mit dem Gen für HK620TSP in pCR-XL-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) wurde freundlicherweise von A.J. Clark zur Verfügung gestellt.

2.1.4.2. Oligodesoxynukleotide

Alle Oligodesoxynukleotide wurden im Maßstab 10 nmol, entsalzt und ohne weitere Reinigungsstufen von Sigma-Genosys (Haverhill, GB) bezogen.

Tabelle 2. Primer für die Klonierung von Tailspike Fragmenten

Konstrukt	Primer	Zielvektor	Restriktionsenzyme
HK620TSP ΔN	5'-AATGCTACCATGGACCC-TGACCAGTTCAGG-3' 5'-TTCTGACGGATCCTCAC-ACCTGACGCTGCAG-3'	pET11d	NcoI, BamHI
HK620NDH6	5'-GGGAATCCGGATCCACA-GATTC AATAAATGCCA-3' 5'-CCGTTAGGGAATTCAAG-CACCTTCTGGTGACTC-3'	pProexhtb	BamHI, EcoRI
HK620NDStrep	5'-AATGATGGTCTCAGCGCA-CAGATTCAATAAATGCC-3' 5'-AGTCCGGTCTCATATCAA-GCACCTTCTGGTGACT-3'	pASK-IBA7	Bsal
Sf6NDH6	5'-TTACTCAGAGTCATATGA-CAGACATTATAA CCAATG-3' 5'-CGATCCGCTC GAGGGAT-TGA GCTAGTTGCT CAA-3'	pET21a	NdeI, XhoI
Sf6Chymo	5'-GGCCCCTAGCTAGCTCA-GATGGCCAGATAC-3' 5'-TATCCTGGCCATGGGTG-TTATTGATGATGG-3'	pET11d	NheI, NcoI

Sequenzierprimer: für pSf6ΔN (Sf6TSPΔN in pET11a (Freiberg *et al.*, 2003)) (bp 361-1914)

T7-Terminator:	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (bp 256-274)
Sf6 seq1:	5'-GATAGCGTAGAGGCTTATIGA-3' (bp 690-709)
Sf6 seq2:	5'-AACCAATGCACATGGTCTCA-3' (bp 1095-1114)
Sf6 seq3:	5'-AACACAGATCCTGTAA-3' (bp 1511-1530)
T7-Promotor:	5'-TAATACGACTCACTATAGG-3' (bp 2002-1984)

Sequenzierprimer für pHK620 Δ N (HK620TSP Δ N in pET11d) (bp 325-2125)

T7-Terminator:	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (bp 256-274)
HK620 seq1:	5'-AGAGTATGCAGCTAAACATG-3' (bp 690-709)
HK620 seq2:	5'-CCAATACTTACGATGTTACC-3' (bp 1100-1119)
HK620 seq3:	5'-ATTCCAGCCTAAGGTAATAG-3' (bp 1510-1529)
HK620 seq4:	5'-AATTCCTACTATGCCCTGCAA-3' (bp 1810-1829)

Tabelle 3. Mutageneseprimer für pSf6 Δ N

Mutante	Sequenz ^a	Restriktions-schnittstelle ^b
D141N	5'-CTCAGATAACGGCCGATcGTGTtGAATCATAAGACAGCC-3' 5'-GGCTGCTTATGATTCAaACACgATCGGCCGTTATCTGAG-3'	PvuI
E187Q	5'-GCGGTTTCAACcTggTTaACCATTACATTATCAAATACCC-3' 5'-GGGTATTTGATAATGTAATGGTtAAccAgGTTGAAACCGC-3'	HpaI
D238N	5'-TGCCAAAGCTTTcGtTAGCAGAgTAATTTCTCTGCTG-3' 5'-CAGCAGAGGAAATTAcTCTGCTaAcGAAAGCTTTGGCA-3'	XmnI
D281N	5'-CATATGCAAATCAAGGCAGtTATGAACATAGAC-3' 5'-GTCTATGTTcATaAcTGCCTTGATTTGCATATG-3'	BspHI
E189Q	5'-CTTGCATTAATAAGCGGTcTgtACTTCATTACC-3' 5'-GGTGAATGAAGTAcAgACCGCTTATTAATGCAAG-3'	RsaI
E239Q	5'-CCAAAGCTcT gATCAGCAGA gTAATTTCTCTGCTG-3' 5'-CAGAGGAAAT TAcTCTGCTG ATcAgAGCTT TGG-3'	XmnI
E303Q	5'-TTTACATTCT gTATAACCAC aCCgGTTGAG CCGC-3' 5'-GCGGCTCAAC cGgTGTGGTT ATAcAGAATG TAAA-3'	AgeI
E324Q	5'-TATATCCCCG TAAATTGcTg AGTAcCATCG GCATC-3' 5'-GATGCCGATG GtACTcAgCA ATTTACGGGG ATATA-3'	RsaI
E365Q	5'-GAAGATCGCC GACTGcTgTA TaGCTATACT TTG-3' 5'-CAAAGTATAG CtATAcAgCA GTCGGCGATC TTC-3'	AluI ^c

^a In Kleinbuchstaben sind die mutierten Basen angegeben.

^b Zusätzliche stille Mutationen resultieren für das betreffende Enzym in einer vom Wildtyp abweichenden Fragmentierung.

^c Für AluI wird kein sinnvolles, vom Wildtyp unterscheidbares Fragmentmuster erhalten.

2.1.5. Bakterienstämme

Getötete Zellen von *E. coli* H TD2158 (Dhillon *et al.*, 1998) wurden freundlicherweise von A.J.Clark zur Verfügung gestellt. Getötete Zellen von *Shigella flexneri* erhielten wir freundlicherweise von S. Miller.

<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene (La Jolla, CA, USA) (Bullock <i>et al.</i> , 1987): <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i> ^c .
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen (über Merck, Darmstadt) (Dubendorff & Studier, 1991b; Dubendorff & Studier, 1991a): F- <i>ompT hsdS_B (r_Bm_B) gal dcm</i> (DE3).
<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen (Karlsruhe): F- ϕ 80d <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r_K, m_K⁺) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i> .
<i>E. coli</i> B834(DE3)	Novagen (über Merck, Darmstadt): F- <i>ompT hsdS_B (r_Bm_B) gal dcm met</i> (DE3).
<i>E. coli</i> GJ1158	Renato Morona (Bhandari & Gowrishankar, 1997).

2.1.6. *Sonstiges Material*

Dialyseschläuche Spectrapor	Spectrum (Houston, USA)
Kunststoff-Fluoreszenz-Makroküvetten	Semadeni (Ostermündingen, Schweiz)
Quartzglas-Suprasil-Küvetten	Hellma, Mülheim
Sterilfilter (0.2 µm)	Renner, Darmstadt
Ultrafiltrationsmembranen	Amicon, Witten
Kieselgel 60 auf Aluminiumfolie	Merck, Darmstadt
Kristallisationsschalen	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Kupferdrahtschlaufen für Kristalle	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Kristallisationsbesteck	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)

2.1.7. *Geräte*

HPLC-Systeme:	Kontron Instruments, Neufahrn
Äkta Purifier	Shimadzu GmbH, Duisburg
Zweistrahl-UV-VIS-Spektrophotometer	GE Healthcare, Freiburg
Fluoreszenzdetektor JASCO 920 S	JASCO, Groß-Umstadt
Spektropolarimeter JASCO J-715	JASCO, Groß-Umstadt
Spex-Fluoromax Spektrofluorimeter	JASCO, Groß-Umstadt
Cary 50 UV-VIS-Spektrophotometer	Jobin Yvon Horiba, Edison (NJ, USA)
Ultrazentrifuge SORVALL Discovery M150	Varian, Darmstadt
Massenspektrometer Bruker Reflex II	Kendro, Langenselbold
X-ray Generator Rigaku RU H2B 3x0.3-Focus	Bruker, Bremen
Detektoren	Rigaku, Kent, UK
	IMAGING PLATE 345 mm DTB mit MaxFlux System, IMAGING PLATE 300 mm mit Graphitmonochromator, MarResearch, Norderstedt
Kühlsystem	Oxford Cryosystems, Oxford, UK

2.1.8. *Software*

Gelscan	BioSciTec, Frankfurt/M.
MATHEMATICA	Wolfram Res. (Long Hanborough, UK)
SCIENTIST	MicroMath Res. (St. Louis, MS, USA)

2.1.9. *Medien, Antibiotika und Puffer*

LB-Medium

10 g/L Bacto Trypton, 5 g/L Bacto Yeast Extract, 5 g/L NaCl, 1.5 % (w/v) Bacto Agar (nur für Kulturplatten), mit 1 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt und autoklaviert.

Stammlösungen

Ampicillin	100 g/L in <i>aqua bidest.</i>
Kanamycin	10 g/L in <i>aqua bidest.</i>
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	238.3 g/L in <i>aqua bidest.</i>

Alle Stammlösungen wurden sterilfiltriert und aliquotiert bei -20 °C gelagert und den Medien im Verhältnis 1:1000 (Kanamycin 1:200) zugesetzt.

2.2. Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, in sterilen Gefäßen bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.1. Kultivierung und Erhaltung von Bakterien

Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agar-Platten angeimpft und nach Erreichen der stationären Wachstumsphase (ÜN) zum Impfen größerer Kulturen verwendet. Anzucht von Bakterien erfolgte in LB-Medium mit geeignetem Zusatz von Antibiotika in Schüttelkulturen bei 37 °C, zur Erhöhung der Ausbeute bei der Herstellung von Tailspike Proteinen bei 30 °C. Zur Proteinherstellung wurde *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Bei Bakterien, die pET-Vektoren enthielten, wurde zu Platten und Medium 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Induktion von Proteinexpression erfolgte bei allen pET-Vektoren durch Einstellen einer IPTG-Konzentration von 1 mM im Medium während der log-Phase des Bakterienwachstums (OD_{595nm} ca. 0.8-1.0). Zur längeren Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu gab man 1.6 ml einer stationären ÜN-Kultur zu 0.4 ml 87 % (v/v) Glycerin und lagerte die Kulturen anschließend bei -80 °C.

2.2.2. Kultivierung von Methionin-auxotrophen Bakterien in Minimalmedium

Zellen des Methionin-auxotrophen Stammes *E. coli* B834(DE3), die das entsprechende Plasmid mit einem Tailspike Gen enthielten, wurden in Gegenwart von Ampicillin (100 µg/ml) 5 h in 4 ml LB-Vollmedium bei 37 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 3000 g wurde das Zellpellet in 30 ml New Minimal Medium (NMM) (Budisa *et al.*, 1995) resuspendiert. NMM enthält alle Aminosäuren außer Methionin. Zum Medium wurde zunächst 80 % Seleno-L-Methionin (SeMet) (0.12 mM) und 20 % Methionin (0.04 mM) zugesetzt. Diese Kultur wurde 16 h bei 30 °C geschüttelt und das Pellet nach Zentrifugation in 1 L NMM resuspendiert, das mit 100 % SeMet (16 mM) supplementiert war. Die Zellen wurden bei 30 °C und 180 rpm inkubiert und die Proteinexpression bei OD₅₅₀=1 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach einer weiteren Inkubation von 16 h wurden die Zellen geerntet und das Protein wie unter 1.3.2 beschrieben gereinigt.

2.2.3. Transformation von Plasmiden in Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen wurde das Puffersystem nach Hanahan verwendet (Hanahan, 1983), die Anzucht der Bakterien erfolgte nach Tang (Tang *et al.*, 1994).

2.2.4. Herstellung und Reinigung von Plasmiden

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde üblicherweise in *E. coli* XLI-blue oder DH5α transformiert. Zellen aus stationären ÜNK wurden nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) aufgeschlossen. Dies sowie die weitere Reinigung über Ionenaustauscher erfolgte mit QIAprep® Mini- oder Midi-Kits nach Angaben des

Herstellers. Üblicherweise erhielt man bei QIAprep® Mini aus 5 ml Kultur ca. 30 µg DNA (0.6 µg/µl).

2.2.5. *Restriktionsverdau mit Endonukleasen*

Analytische Verdauungen wurden im 10 µl-Maßstab durchgeführt. Dazu mischte man 3 µl DNA (ca. 1-2 µg) mit 1 µl 10fach Puffer (nach Angaben des Herstellers), evt. BSA-Lösung und Wasser sowie 0.25 µl Enzym und verdaute je nach Enzym 2-3 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurde der gesamte Verdauungsansatz auf Agarosegelen elektrophoretisch getrennt. Bei präparativen Verdauen wurde 30 µl DNA (10-20 µg) mit 1 µl Enzym verdaut und in Gelen aus niedrig schmelzender Agarose getrennt.

2.2.6. *Klonierung von Plasmiden*

Die für die gewünschten Proteine codierenden DNA-Abschnitte (Gene) wurden mittels PCR aus geeigneten Matrizen amplifiziert. Die flankierenden Primer enthielten zusätzlich Restriktionsschnittstellen. Die aus Restriktionsverdau erhaltenen Einzelstrangüberhänge passen komplementär auf die Einzelstrangenden der mit den gleichen Enzymen aufgeschnittenen Zielvektoren. Typischerweise wurden nach der PCR zunächst die Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt, danach erfolgte der Verdau und Reinigung in Agarosegelen. Soweit nicht anders angegeben wurden die Produkte zwischen allen Syntheseschritten mit dem QIAquick® Extraktionskit nach Herstellerangaben gereinigt. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte gibt die Tabelle 2. Für HK620TSP wurde das Gen durch Fragmentaustausch mit BamHI und XbaI aus dem Vektor pCR-XL-TOPO in den Vektor pT7-BsPel (Walter, 2002) eingeführt.

2.2.7. *Ortsgerichtete Mutagenese*

Mutationen im Gen von Sf6TSPΔN wurden mit Hilfe des QuikChange® Kits (Stratagene) nach Angaben des Herstellers ausgeführt, allerdings wurde der Reaktionsansatz halbiert. Die gewünschte Mutation wird über zwei Primer auf beiden DNA-Strängen eingeführt (Tabelle 3). Als Matrize dient das Plasmid, das das Wildtypgen trägt. Es wurden je Ansatz 125 ng je Primer und 25-50 ng Templat eingesetzt. Die mitgelieferte Polymerase PfuTurbo® amplifiziert das gesamte Plasmid mit hoher Genauigkeit. Es wurde in XL1-Blue superkompetente Zellen transformiert, aus denen es hinterher zur Analyse charakteristischer Restriktionsschnittstellen und zur Sequenzierung isoliert wurde. Jedes mutierte Gen wurde komplett sequenziert.

2.2.8. *Sequenzierung von Plasmid-DNA*

Alle Gene, die als PCR-Produkte in Plasmide kloniert wurden, wurden vollständig sequenziert. Alle Plasmide nach PCR-Mutagenese wurden ebenfalls sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte an der Universität Potsdam in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralph Tiedemann.

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. Datenbankeinträge Swiss-Prot

Die in dieser Arbeit verwendeten Aminosäuresequenzen sind in der Datenbank Swiss-Prot (Apweiler *et al.*, 2004) unter folgenden Nummern abgelegt:

HK620TSP:	P22TSP:	Sf6TSP:
Q9AYY6	P12528	Q9XJP3

2.3.2. Herstellung und Reinigung von Tailspike Proteinen

Tabelle 4. Reinigungsprotokolle für Tailspike Proteine

Reinigungsschritt	P22TSP	Sf6TSP	HK620TSP
Ammoniumsulfatfällung	35 % Sättigung, Präzipitation 1 h bei 4 °C.	35 % Sättigung, Präzipitation 1-2 Tage bei 4 °C.	35 % Sättigung, Präzipitation 1 h bei 4 °C.
Ionenaustauschchromatographie	Gradient 6 SV 0-0.2M NaCl. Elution bei ca. 50-100 mM NaCl.	Gradient 6 SV 0-300 mM NaCl, Elution bei ca. 100 mM NaCl	Waschen mit 3 SV 50 mM NaCl, Stufengradient: 2 SV 0.1 M, 2 SV 0.2 M, 6 SV 0.5 M NaCl. Elution bei ca. 100 mM NaCl
Hydrophobe Interaktionschromatographie	Gradient 0.2-0 M Ammoniumsulfat, Elution bei 0 M am Ende des Gradienten.	Gradient 0.8-0 M Ammoniumsulfat, Elution bei 0.5 M – 0 M	Gradient 0.5-0 M Ammoniumsulfat, Elution bei 0 M (Auswaschen mit Puffer)

Die Reinigung von rekombinant in *E. coli* erzeugten Tailspikeproteinen erfolgt prinzipiell nur leicht verändert nach dem von Stefan Miller entwickelten Verfahren für P22TSP (Miller, 1995). Für Sf6TSP und Sf6TSP Δ N wurde die Reinigung von Alexander Freiberg entwickelt und beschrieben (Freiberg *et al.*, 2003). Für HK620TSP und HK620TSP Δ N wurde das Reinigungsprotokoll in leicht veränderter Form übernommen. Anzucht und Induktion der Proteinexpression (s.o.) erfolgten bei 30 °C über Nacht. Alle Reinigungsschritte wurden in Standardpuffer (20 mM TrisHCl, pH 7-7.8, 1 mM NaEDTA) durchgeführt. Nach Ernte durch Zentrifugation und Hochdruckzellyse (French Press) wurde 1 h bei 40000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 35 % Ammoniumsulfat gefällt, zentrifugiert und gegen Standardpuffer dialysiert. Die erhaltene Proteinlösung wurde mittels Ionenaustauschchromatographie auf DE52 Cellulose Anionentauscher und hydrophober Interaktionschromatographie auf Phenylsepharose gereinigt. Zum Schluss erfolgte eine Gelfiltration auf einer HiLoadSuperdex 200 Säule mit 200 mM NaCl im Stan-

dardpuffer. Für Selenomethioninmutanten wurde allen Puffern 5 mM DTT zugesetzt. Für Einzelheiten siehe Tabelle 4. Die N-terminale Sequenzierung von HK620TSP, Sf6TSP und ihren verkürzten Varianten ergab, dass bei allen Proteinen bis auf HK620TSP Δ N der N-terminale Methioninrest abgespalten wurde.

2.3.3. Modifiziertes Reinigungsprotokoll für HK620TSP Δ NMet(Se)

Bei einer Selenomethioninmutante von HK620TSP Δ N, die kristallisiert werden konnte, wurden während der Reinigung zwei Schritte ausgetauscht. Nach French Press und Dialyse wurde die Proteinlösung auf 0.5 M Ammoniumsulfat eingestellt und wie in Tabelle 4 beschrieben über Phenylsepharose chromatographiert. Anschließend wurde über eine Mono-Q 5/50 GL Ionenaustauschsäule (GE Healthcare) mit einem Stufengradienten von 6 SV Standardpuffer (siehe 1.3.2.), 9 SV 0.05 M NaCl in Standardpuffer, und 30 SV eines Gradienten von 0.05 M nach 0.3 M NaCl in Standardpuffer gereinigt. Dabei eluiert das Protein in zwei Peaks bei ca. 0.05 M und 0.1 M NaCl. Die Gelfiltration erfolgte wie in 1.3.2. beschrieben.

2.3.4. Proteinsequenzierung (Edman)

Die N-terminalen Sequenzen der in der Arbeit hergestellten Tailspike Proteine wurden durch Sequenzierung überprüft. Sie erfolgte nach dem Edman-Verfahren und wurde bei Albrecht Otto am Max-Delbrück-Zentrum Berlin durchgeführt.

2.3.5. Herstellung von N-terminalen Domänen von Tailspike Proteinen

Die Herstellung der N-terminalen Domäne von Sf6TSP mit Hexahistidintag (Sf6TSPNDH6) erfolgte wie für die N-terminale Domäne von P22TSP beschrieben (Miller, 1995). Für die N-terminale Domäne von HK620TSP (HK620NDStrep) wurde wegen geringer Expressionsausbeuten zunächst über Fragmentaustausch mit HindIII und NheI in pET11d unter T7-Promotor-Kontrolle umklontiert. Das resultierende Plasmid [HK620NDStrep]pET-11d wurde in BL21(DE3) transformiert und die Zellen nach Induktion bei $OD_{595}=1$ mit 1 mM IPTG über Nacht bei 30 °C inkubiert. Nach French Press Zellyse wurde der Überstand nach Anweisung des Herstellers auf die Affinitätsmatrix aufgetragen (Strep-tag Starter Kit, IBA). Das Protein eluierte als einzelne Bande. Nach Gelfiltration auf Superdex 75 (GE Healthcare) betrug die Reinheit mehr als 95 % (SDS-PAGE mit Silberfärbung).

2.3.6. Proteolytischer Verdau von Tailspike Proteinen

Verdau nach Populieren eines thermischen Entfaltungsintermediats

HK620TSP lässt sich nur nach Erhitzen teilweise proteolytisch abbauen. Dafür wurde zunächst ein Ansatz von 220 μ l 1 mg/ml Protein in 50 mM NaMOPS, pH 7.2, 1 mM NaEDTA, 5 mM CaCl₂ hergestellt. 20 μ l davon wurden als Kontrolle zurückbehalten. Die restlichen 200 μ l werden eine Stunde auf 90 °C erhitzt und die Probe anschlie-

ßend auf Eis gekühlt. Zur Kontrolle wurde erneut ein 20 µl-Aliquot entnommen. Dann wurde 1 µl einer 1 mg/ml Trypsinstammlösung in Puffer zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots von 20 µl entnommen, jeweils 10 µl einer 1 mg/ml Stammlösung von BPTI (*Bovine Pancreas Trypsin Inhibitor*) in Puffer zugegeben und nach dem Abkühlen auf Eis mit 20 µl Lämmli-Probenpuffer vermischt. Alle Proben wurden bei 4 °C gelagert und auf 10 %igen SDS-Gelen analysiert.

Verdau von nativen Tailspike Proteinen

Sf6TSP lässt sich auch ohne Erhitzen teilweise proteolytisch prozessieren. Dafür wurde ein Ansatz von 220 µl 1 mg/ml Protein in 50 mM NaMOPS, pH 7.2, 1 mM NaEDTA, 5 mM CaCl₂ hergestellt und wie oben beschrieben mit Trypsin oder Chymotrypsin behandelt und auf 10 %igen SDS-Gelen analysiert.

2.3.7. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach King und Laemmli (King & Laemmli, 1971). Als Laufpuffer wurde das Puffersystem nach Fling und Gregerson verwendet (Fling & Gregerson, 1986). Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit je einem fünftel Volumen 10 % SDS-Lösung (w/v) und Auftragspuffer (325 mM TrisHCl, pH 6.8, 500 mg/ml Glycerin, 0.5 mg/ml Bromphenolblau) versetzt und gegebenenfalls zur Denaturierung erhitzt.

Coomassie-Färbung

Die Coomassiefärbung wurde nach einer modifizierten Methode nach Fairbanks durchgeführt (Fairbanks *et al.*, 1971). Dazu wurden die Gele zunächst 10 Minuten in einer Mischung aus 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig und 0.1 % (w/v) Serva Blau R250 vorinkubiert. Die weitere Färbung erfolgte gemäß den Literaturangaben. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0.2-0.5 µg Protein/mm² Gel.

Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Heukeshoven und Dernik (Heukeshoven & Dernick, 1988). Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0.05-0.1 ng Protein/mm² Gel.

Densitometrische Auswertung von Polyacrylamidgelen

Die Quantifizierung Coomassie-gefärbter Banden in Polyacrylamidgelen wurde nach Einscannen mit einem herkömmlichen Farbscanner und dem Umwandeln in Graustufen mit der Software Gelscan durchgeführt.

2.3.8. Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC)

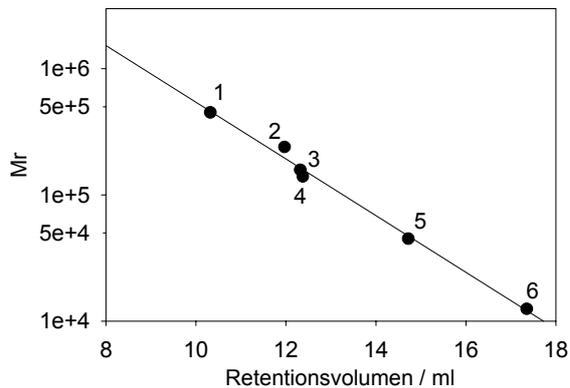


Abbildung 11.

Kalibrierung von Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) mit (1) Ferritin (450 kD), (2) Katalase (240 kD), (3) Aldolase (158 kD), (4) Laktatdehydrogenase (140 kD), (5) Albumin (45 kD), (6) Cytochrom C (12.5 kD) (alle Proteine von GE Healthcare).

Mr: Logarithmische Skala.

Die analytische Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) erfolgte auf einer Superdex 200 HR 10/30 Säule (GE Healthcare) unter Verwendung des Äkta Purifier HPLC-Systems. Als mobile Phase wurde 50 mM TrisHCl, pH 7, 1 mM NaEDTA, 200 mM NaCl verwendet. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/ml, das Probenvolumen betrug 200 µl. Zur Kalibrierung wurden globuläre Standardproteine unter den gleichen Bedingungen vermessen.

2.3.9. Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Alle AUZ-Experimente wurden bei Dr. Helmut Cölfen am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Golm von Antje Völkel durchgeführt. Sedimentationsgleichgewichts- und geschwindigkeitsexperimente erfolgten in einer Optima XLI Ultrazentrifuge von Beckman Coulter (Palo Alto, CA, USA) mit Absorptionsoptik. Die Durchführung ist ausführlich beschrieben worden (Seul, 2003). Zur Auswertung wurden die Programme SEDFIT (Schuck, 2000) und MStar (Helmut Coelfen) verwendet.

2.3.10. Kalorimetrie

Die DSC-Messungen wurden mit einem Microcal™ Inc. VP-DSC MicroCalorimeter von Alexander Freiberg durchgeführt. Aufbau und Durchführung des Experiments sind beschrieben worden (Freiberg, 2004).

2.4. Faltungsmethoden

2.4.1. Stabilitätsanalyse durch thermische Denaturierung

Thermische Denaturierung ohne SDS

Ein Ansatz von 200 µl Protein (1 mg/ml) wurde auf 80 °C erhitzt und zu verschiedenen Zeitpunkten 20 µl Aliquots entnommen. Nach dem Kühlen auf Eis wurden 10 µl Puffer und 20 µl Lämmli-Probenpuffer zugegeben, bei 4 °C gelagert und die Proben auf 10 %igen SDS-Gelen analysiert.

Kinetiken der thermischen Denaturierung in Gegenwart von SDS

Die Durchführung erfolgte wie beschrieben (Miller *et al.*, 1998b). Ansätze von je 40 µl Protein (50 µg/ml) in 50 mM TrisHCl, pH 7, 150 mM β-Mercaptoethanol, 2 %SDS (w/v) wurden in dünnwandigen PCR-Cups im Wasserbad erhitzt und die Reaktion zu unterschiedlichen Zeiten zunächst auf Eis und dann durch Zugabe von Lämmli-Probenpuffer gestoppt, in der SDS-PAGE analysiert und densitometrisch ausgewertet. Die Peakflächen in Prozent wurden gegen die Zeit aufgetragen und die Kinetiken im Programm SCIENTIST gefittet. Für ein Modell TR → I → M (konsekutive Reaktionen 1. Ordnung) verwendet man die analytische Lösung der Differentialgleichungen (Szabó, 1969) (siehe Anhang):

$$(1) \quad dTR/dT = -k_1 * TR$$

$$(2) \quad dI/dT = k_1 * TR - k_2 * I$$

$$(3) \quad dM/dT = k_2 * I.$$

Für ein Modell TR ⇌ I → M (konsekutive Reaktionen 1. Ordnung mit einem reversiblen Schritt) bestimmte man die analytische Lösung folgender Differentialgleichungen (Szabó, 1969) mit dem Programm Mathematica:

$$(4) \quad dTR/dT = -k_{hin} * TR + k_{rue} * I$$

$$(5) \quad dI/dT = k_{hin} * TR - (k_{rue} + k_{den}) * I$$

$$(6) \quad dM/dT = k_{den} * I$$

2.4.2. Stabilitätsanalyse durch Denaturierung mit Chaotropen

Denaturierungskinetiken

Zur Messung von Denaturierungskinetiken wurde die Proteinlösung direkt unter Rühren 1:100 in eine Kunststoff-Fluoreszenzküvette verdünnt. Die Proteinendkonzentration betrug 10 µg/ml, wenn nicht anders angegeben. Anregungswellenlänge und Emissionswellenlänge sowie die genauen Pufferbedingungen und die Temperatur sind bei den einzelnen Experimenten angegeben.

Langzeitdenaturierung und -renaturierung

Zur Messung von Langzeitkinetiken („Übergängen“) von Tailspike Proteinen wurden Stammlösungen des Proteins zunächst mit dem jeweiligen Puffer oder mit GdmHCl in Puffer auf 1 mg/ml verdünnt. Die Probe in 6 M Denaturierungspuffer wurde

1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden native und denaturierte Probe unter Rühren 1:100 in 2 ml-Eppendorfgefäße in Puffer mit verschiedenen GdmHCl-Konzentrationen verdünnt. Die Proben wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann bis zur Messung bei 10 °C aufbewahrt. Die Proben wurden CD-spektroskopisch oder fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Dabei wurden die Konzentrationen des Denaturierungsmittels in Puffern und Proben refraktometrisch bestimmt (Pace, 1986). Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist bei den jeweiligen Ergebnissen angegeben.

2.5. Herstellung von Kohlenhydraten, Kohlenhydratanalytik und Enzymtests

2.5.1. Herstellung von Lipopolysaccharid aus Bakterien

Lipopolysaccharid wird mittels heißer Phenolextraktion hergestellt (Westphal & Jann, 1965; Westphal *et al.*, 1952), dies wurde ausführlich beschrieben (Baxa, 1995). Zur Isolierung und Reinigung von Lipopolysaccharid von *Shigella flexneri* und *E. coli* H geht man wie folgt vor: 3-4 g Trockenmasse toter Zellen wurden in 100 ml Wasser resuspendiert und bei 65 °C mit 100 ml 90 % (w/w) vorgewärmtem Phenol in Wasser versetzt. Diese Mischung wurde 30 min bei 65-69 °C gerührt, gekühlt und zentrifugiert. Die Wasserphase wurde abgenommen, und die Phenolphase erneut mit 100 ml Wasser bei 65-69 °C extrahiert und beide Wasserphasen vereinigt. Der pH-Wert wurde mit 4 ml 1 M Tris auf 8.5 eingestellt (final 50 mM TrisHCl) und die Wasserphase zweimal mit 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Lösung wurde lyophilisiert und das Produkt mittels Ethanol-fällung gereinigt (Baxa, 1995), anschließend dialysiert und gefriergetrocknet.

2.5.2. Herstellung von Polysaccharid und Verknüpfungsanalyse

Zur Herstellung von Polysaccharid wurden 15 mg LPS in 5 ml 200 mM Ammoniumacetat pH 3.6 mit Ultraschall auf Eis gelöst und anschließend 3 h bei 45 °C inkubiert. Unlösliches Lipid A wurde abzentrifugiert und der Überstand lyophilisiert. Die Verknüpfungsanalyse der Monosaccharidbausteine des Polysaccharides wurde im Labor von Dr. Markus Pauly, Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie Golm, durchgeführt.

2.5.3. Verdau von Lipopolysaccharid mit Tailspike Proteinen

Herstellung von Oligosacchariden

Zur Herstellung von Oligosacchariden wurde das Lipopolysaccharid vollständig verdaut. Die Reaktionsdauer wurde zuvor im Aktivitätstest bestimmt. 20 mg Lipopolysaccharid wurden in 1 ml 0.1 % (w/v) Natriumdeoxycholat in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat gelöst. Nach Zugabe von Tailspike Protein (finale Konzentration 20 µg/ml) wurde 2 h bei 37 °C verdaut. Anschließend fällte man Protein und Deoxycholat mit 10 µl Eisessig aus und zentrifugierte vom Unlöslichen. Das Lipopolysaccharid wurde mit 80 %

Ethanol ausgefällt. Der Überstand enthielt die Oligosaccharide und wurde im Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde in 50 % (v/v) Acetonitril gelöst und die Oligosaccharide wie in Abschnitt 2.5.4. beschrieben analysiert.

Aktivitätstest

Für den Aktivitätstest wurde 30 mg/ml Lipopolysaccharid in 50 mM TrisHCl pH 7, 1 mM NaEDTA gelöst, auf 37 °C temperiert und zum Start der Reaktion 50 µg/ml Tailspike Protein zugegeben. Das Volumen des Ansatzes betrug 550 µl. Zu verschiedenen Zeiten wurden 50 µl-Aliquots entnommen und die Reaktion durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff gestoppt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert und die entstandenen reduzierenden Enden im DNSA-Test bestimmt.

2.5.4. Nachweis von reduzierenden Enden mit Dinitrosalicylsäure

Der DNSA-Test wurde beschrieben (Danner *et al.*, 1993), (Seckler *et al.*, 1989). Zu untersuchende 50-µl-Aliquots wurden mit 50 µl Dinitrosalicylsäurelösung (20 mg/ml in 0.7 M NaOH) 5 min auf 100 °C erhitzt und bei 535 nm vermessen. Um die Konzentration an reduzierenden Enden zu bestimmen, wurde eine Eichreihe mit Glucose gemessen.

2.5.5. Reinigung und Nachweis von Oligosacchariden

Dünnschichtchromatographie wurde auf Kieselgel 60 auf Aluminiumfolie durchgeführt. Als mobile Phase verwendete man 60 % (v/v) 1-Propanol und 10 % Nitromethan in Wasser, als Standards Mannose und Oligomannane (2 mM Lösungen in Wasser).

Analytische Gelfiltration erfolgte auf einer Superdex Peptide HR 10/30 Säule an einem HPLC-Flußsystem mit UV-Detektion von N-Acetylglucosamin bei 214 nm. Als Laufmittel benutzte man Wasser. Als Größenstandards für die Gelfiltration dienten *Shigella* Dodecasaccharid und *Shigella* Oktasaccharid. Fraktionen von 1 ml werden manuell gesammelt und auf ihren Oligosaccharidgehalt mittels MALDI-MS untersucht. Dazu lyophilisierte man die Proben und nahm sie anschließend in 10 µl 50 % Acetonitril (v/v) auf.

Oligosaccharide wurden, wenn nicht anders angegeben für MALDI-MS mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (10 mg/ml in 10 % (v/v) Ethanol-Wasser) als Matrix auf dem Target kristallisiert. Dazu mischte man 0.5 µl Probe mit 0.5 µl Matrixlösung. Bei dieser Präparation erhält man im Massenspektrum die Molekülonen als einfach geladene Natriumaddukte (Stahl *et al.*, 1991). Für ESI-MS wurden die Proben in 5 % Ameisensäure gesprüht.

2.5.6. Analyse der Monosaccharidzusammensetzung von Zuckern

Die Monosaccharidzusammensetzung wurde nach saurer Hydrolyse der Oligosaccharide auf einer Dionex-Säule anhand von Standards bestimmt. Diese Analyse wurde von Dr. Sophie Haebel, Interdisziplinäres Zentrum für Massenspektrometrie von Biopolymeren an der Universität Potsdam, durchgeführt.

2.5.7. *Markierung von Oligosacchariden mit 7-Aminomethylkumarin*

Die Markierung von Oligosacchariden mit 7-Aminomethylkumarin ist von U. Baxa beschrieben worden (Baxa *et al.*, 1996).

2.5.8. *Aktivitätstest von Tailspike Proteinen mit markierten Oligosacchariden*

Die Hydrolyseaktivität von Tailspike Proteinen gegenüber ihren Substraten wurde mit fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden definierter Länge mit dem bei Baxa beschriebenen Aktivitätstest überprüft (Baxa *et al.*, 1996). Für Sf6TSP verfährt man folgendermaßen: Ein Ansatz von 50 mM NaMOPS (pH 7.2), 1 mM NaEDTA, der die entsprechende Menge des Saccharids enthielt, wurde im Kühlraum (4 °C) im Wasserbad auf 15 °C temperiert und die Reaktion durch Zugabe des Proteins gestartet. Das Volumen des Ansatzes betrug 55 µl. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 5 µl-Aliquots entnommen und mit 5 µl 0.125 M HCl versetzt und nach 5 min bei RT mit 5 µl 0.125 M NaOH neutralisiert, um die Säurehydrolyse der Oligosaccharide zu verhindern. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Die Hydrolyseprodukte wurden auf einer Beckman ultrasphere C18 reversed phase Säule (5 µ, 250 mm x 4.6 mm, Säulenvolumen 4.15 ml) an einem Kontron-HPLC-System analysiert. Als Laufmittel A verwendete man 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, als Laufmittel B 0.1 % TFA (v/v) in 70 % (v/v) Acetonitril in Wasser. Bei einem Fluss von 1 ml/min verlief der Gradient von 0 auf 30 % B in 20 min. Danach wurde 5 min mit 100 % B und 10 min mit 100 % A gespült. Die Detektion der Saccharide erfolgte über die Fluoreszenzemission der Label bei 450 nm (Anregung 360 nm) mit einem Jasco FP-920 Fluoreszenzdetektor.

2.6. **Spektroskopische und massenspektrometrische Methoden**

2.6.1. *Absorptionsspektroskopie zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten und der Proteinkonzentration*

Alle Proteinspektren wurden zwischen 340 und 240 nm in Quarzglas Küvetten an einem Cary 50 Probe Einstrahl-UV-VIS-Spektrophotometer oder an einem Jasco V-560 Zweistrahl-UV-VIS-Spektrophotometer aufgenommen. Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wurden jeweils 4 Spektren in 50 mM NaMOPS pH 7.2 oder in 50 mM NaMOPS pH 7.2, 6 M GdmHCl aufgenommen und der Extinktionskoeffizient nach der Methode von Pace bestimmt (Pace & Schmid, 1997). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch durch Aufzeichnung eines Spektrums von 240-350 nm. Nach Prüfung der Probe auf Homogenität und Abwesenheit von Aggregaten (keine Lichtstreuung oberhalb 300 nm) verwendete man den Absorptionswert bei 280 nm zur Berechnung der Konzentration (Tabelle 5) nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Alle molaren Konzentrationsangaben für die Tailspike Proteine beziehen sich auf Untereinheiten.

2.6.2. Fluoreszenzspektroskopie

Alle Fluoreszenzmessungen wurden an einem Spex-FluoroMax-Spektrofluorometer mit thermostatisiertem Küvettenhalter durchgeführt. Alle verwendeten Puffer waren filtriert (0.2 μm Porenfilter) und entgast. Für die Aufnahme von Spektren wurden Quarzküvetten (Firma Hellma) und für die Aufnahme von Kinetiken fluoreszenzgeeignete Kunststoffküvetten (Firma Semadeni) verwendet. Die spektralen Spaltbreiten für Anregung und Emission lagen bei 2.5 bzw. 5 nm.

Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzspektren wurden bei 10 °C und einer Anregungswellenlänge von 280 nm im Emissionswellenlängenbereich von 290-450 nm aufgezeichnet. Dabei wurde alle 0.2 nm mit 0.2 s Integrationszeit gemessen. Alle Spektren wurden gegen die jeweilige Pufferfluoreszenz korrigiert.

Fluoreszenzkinetiken

Zur Messung von De- und Renaturierungskinetiken wurde die Proteinlösung unter Rühren direkt 1:100 in die Küvette verdünnt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm. Die Emissionswellenlängen wurden unterschiedlich gewählt und sind bei den jeweiligen Daten angegeben. Denaturierungskinetiken wurden mit den in das Programm SigmaPlot (Jandel Scientific) implementierten Algorithmen monoexponentiell gefittet. Genaue Pufferbedingungen sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

2.6.3. CD-Spektroskopie

Alle Messungen wurden an einem Jasco J-715 Spektropolarimeter bei einer Mess-temperatur von 10 °C durchgeführt. Die verwendeten Puffer waren filtriert (0.2 μm Porenfilter) und entgast. Die Proteinlösung wurde vor jeder Messung 20 min ultrazentrifugiert (40 000 rpm, 4 °C). Es wurden Fern-UV-Spektren im Bereich von 182-250 nm und Nah-UV-Spektren im Bereich von 250-450 nm aufgenommen. Der Messpunkt-Abstand be-

Tabelle 5. Extinktionskoeffizienten von Tailspike Proteinen bei 280 nm (pro Untereinheit)

Protein	$\epsilon / \text{ml mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
P22TSP	1.01	72442
P22TSP ΔN	1.14	68600
P22TSP NDH6	0.72	10430
Sf6TSP	0.93	62371
Sf6TSP ΔN	0.94	51961
Sf6TSP NDH6	0.8 ^a	11933 ^a
HK620TSP	1.17 (1.16 ^a)	88750 ^a
HK620TSP ΔN	1.36 (1.21 ^a)	78630 ^a
HK620TSP NDH6	0.8 ^a	11920 ^a

^a theoretischer Extinktionskoeffizient für denaturiertes Protein, berechnet nach (Pace *et al.*, 1995)

trug 0.5 nm bei einer Scangeschwindigkeit von 20 nm/min, die Bandbreite war 2 nm, die Responsezeit betrug 4 s. Es wurde jeweils über 15 Spektren gemittelt. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert. Für den Vergleich von Spektren wurden die Messwerte in die molare Elliptizität umgerechnet (Schmid, 1997).

2.6.4. *Fourier-Transform-Infrarot (FTIR) Spektroskopie*

Infrarotspektren wurden in 50 mM Kaliumphosphat pD 7 in Calciumfluoridzellen mit einer Schichtdicke von 25 μ m an einem Fourier Transform Infrarotspektrometer IFS66 (Bruker) bei Frau Dr. Christiane Jung, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin Buch, aufgenommen und wie beschrieben ausgewertet (Freiberg *et al.*, 2003).

2.6.5. *Massenspektrometrie*

Alle massenspektrometrischen Untersuchungen wurden im Interdisziplinären Zentrum für Massenspektrometrie von Biopolymeren an der Universität Potsdam durchgeführt. Für MALDI-MS verwendete man ein Reflex II Bruker Massenspektrometer. Zur Präparation von Peptidproben auf dem Target wurden, soweit nicht anders angegeben, 0.5 μ l Probe mit 0.5 μ l einer gesättigten Lösung von α -Cyano-4-hydroxymizsäure in 50 % (v/v) Acetonitril in 0.1 % (v/v) Trifluoressigsäure vermischt und nach der Dünnschichtmethode kristallisiert. Die Messung erfolgte im reflektiven Modus bei 25 kV Hochspannung nach Angaben des Herstellers. Die ESI-q-TOF-Messungen wurden von Dr. Sophie Haebel an einem API QSTAR Pulsar I Massenspektrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex) mit Elektrospray-Ionenquelle durchgeführt.

2.7. **Kristallographische Methoden**

Alle kristallographischen Arbeiten fanden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Heinemann am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch statt. Die Messungen mit Synchrotronstrahlung am ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France, <http://www.embl-grenoble.fr>) und am EMBL/DESY (European Molecular Biology Laboratory am Deutschen Elektronen Synchrotron, Hamburg, <http://www.embl-hamburg.de>) erfolgten durch Dr. Michael Kolbe (HK620TSP) und Dr. Jürgen Müller (Sf6TSP, HK620TSP), der auch die Datenbearbeitung und Phasierung durchgeführt hat.

2.7.1. *Proteinkristallisation*

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Proteinlösungen vor dem Kristallisieren in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7 dialysiert und Aggregate durch Ultrazentrifugation (40 000 rpm, 20 min, 4 °C, Ultrazentrifuge SORVALL Discovery M150) entfernt. Die Kristallisationsbedingungen wurden durch Screening mit dem Hampton Crystal ScreenJ und Crystal Screen2J ermittelt. Alle Ansätze wurden in Plastikschalen mit 4x6

Vertiefungen angesetzt und im hanging drop Verfahren an silanisierten Quarzdeckgläsern kristallisiert. Das Volumen der Reservoirlösungen betrug 750 μl .

2.7.1.1. Kristallisation von HK620TSP Δ N und HK620TSP Δ NMet(Se)

Die Kristallisationsbedingungen für HK620TSP Δ N waren nicht reproduzierbar (siehe Ergebnisteil). Gelegentlich erhielt man nach ca. 12 Wochen Kristalle unter folgender Bedingung: 1-3 μl Proteinlösung (4-8 mg/ml) wurden auf dem Deckglas mit 1-3 μl einer wässrigen, ungepufferten Lösung von 10-30 % PEG 1500, pH 3 (pH mit Salzsäure eingestellt) gemischt und über der gleichen Lösung als Reservoir bei 20 °C kristallisiert. In Kristallisationsansätzen, die unter gleichen Bedingungen mit HK620TSP Δ NMet(Se) hergestellt wurden, bildeten sich nach Stunden bis Tagen bei 20 °C amorphe Präzipitate. Diese traten bei 4 °, 10 ° und 15 °C nur gelegentlich auf.

2.7.1.2. Soakingexperimente mit Kristallen von HK620TSP Δ N und Schwermetallsalzen)

Zum Soaking von Kristallen von HK620TSP Δ N wurde zunächst durch sukzessives Umsetzen über konzentriertere Lösungen von PEG 1500, pH 3 die PEG-Konzentration der Mutterlaugen auf 35 % erhöht. Anschließend wurden der Mutterlauge wässrige Metallsalzlösungen zugesetzt, so dass die Endkonzentration von PEG 1500 beim Soaken 30 % betrug, dabei zersetzte sich bereits eine größere Zahl von Kristallen sofort. Folgende Metallsalze wurden getestet (in Klammern die finale Konzentration im Tropfen und die Soakingzeit): K_2PtCl_6 (5 mM, 2 h; 10 mM, 2 h; 10 mM, 30 min), K_2PtCl_4 (6.25 mM, 3 h; 1 mM, 0.5 mM, 0.05 mM, 14 Tage), $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{-COO})_2$ (5 mM, 5 Tage; 0.1 mM, 3 h), $\text{Sm}(\text{CH}_3\text{-COO})_3$ (5 mM, 6 h; 5 mM, 5 Tage; 20 mM, 4 h), $\text{KAu}(\text{CN})_2$ (20 mM, 21 Tage), $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{-COO})_2$ (20 mM, 21 Tage).

2.7.1.3. Kristallisation von Sf6TSP Δ N und Sf6TSP Δ NMet(Se)

Zur Kristallisation von Sf6TSP Δ N wurde 1 μl Proteinlösung (11.4 mg/ml in 20 mM Natriumphosphat, pH 7) mit 1 μl 0.1 M MES, pH 6.0, 18 % (w/v) PEG 8000 auf dem Deckglas gemischt und über dem gleichen Puffer als Reservoir bei 20 °C kristallisiert. Kristalle wuchsen in etwa zwei Wochen. Anschließend wurden Kristalle sukzessive umgesetzt in 25 % (w/v) PEG 8000 und in 25 % (w/v) PEG 8000, 15% (v/v) Ethylenglycol und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Unter den verwendeten Bedingungen traten verzwilligte Kristalle auf, Einkristalle wurden optisch und anhand ihres Beugungsmusters selektiert. Zur Kristallisation von Sf6TSP Δ NMet(Se) wurde dem Puffer 20 mM Manganchlorid zugesetzt. Dies führte zum verminderten Auftreten von Zwillingskristallen.

2.7.1.4. Kokristallisation von Sf6TSP Δ N mit Oktasaccharid

Zur Kokristallisation wurden 3 μl Proteinlösung (10 mg/ml in 10 mM Natriumphosphat, pH 7.5, 0.1 mM Untereinheiten) mit 0.6 μl 5 mM Oktasaccharid (0.5 mM final) in Wasser und mit 3 μl 0.1 M MES, pH 6.5, 16 % (w/v) PEG 8000, 20 mM Manganchlorid

auf dem Deckglas gemischt und über dem gleichen Puffer als Reservoir bei 20 °C kristallisiert. Kristalle wuchsen in einer Woche und wurden binnen zwei Wochen wie in Abschnitt 2.7.1.3 beschrieben auf Kryobedingungen umgesetzt.

2.7.2. Datenaufnahme

Kristalle wurden mit Stickstoff auf 100 K gekühlt und die Diffraktion von Cu-K- α -Strahlung an Diffraktometern mit Drehanode in Berlin-Buch getestet (siehe Geräte Abschnitt 2.1.7.). Einzelbilder wurden mit Denzo/Scalepack (Otwinowski & Minor, 1997) indiziert und im Fall von Sf6TSPAN auf das Auftreten von Zwillingskristallen hin überprüft.

Sf6TSPAN(SeMet)

Intensitäten im Röntgenbeugungsmuster wurden an der *beamline* ID14-4 am ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France) von Dr. Jürgen Müller gemessen. Die Messwellenlänge betrug 0.9795 Å. Der Kristall wurde mit Stickstoff auf 100 K gekühlt. Die Datenaufnahme erfolgte an einem ADSC Q4 CCD-Detektor. Es wurde ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 1.98 Å mit 94 % Vollständigkeit und R_{sym} von 5 % aufgenommen ($R_{\text{sym}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$). Die äußere Schale der Ewaldkugel erstreckt sich dabei über den Bereich von 2.06-1.98 Å. Zur Datenbearbeitung und Indizierung verwendete man die Programme XDS/XSCALE (Kabsch, 1993). Die Kristalle haben die Raumgruppe R3. Zellachsen der asymmetrischen Einheit sind $a=95.91$ Å und $c=182.60$ Å.

HK620TSPAN

Native Datensätze wurden an der *beamline* ID14-EH2 am ESRF Grenoble sowie an der *beamline* BW7B am EMBL Hamburg aufgenommen (siehe Ergebnisteil).

2.7.3. Phasierung, Strukturmodellbau und Verfeinerung

Phasen wurden von Dr. Jürgen Müller aus dem Datensatz der Selenomethioninmutante mit der SAD-Methode (single anomalous dispersion) erhalten. Sf6TSPAN(SeMet) enthält 6 SeMet. Die Koordinaten aller 6 Selenatome konnten mit hohen Besetzungszahlen (0.4 - 0.75) und niedrigen Temperaturfaktoren (15.0 - 21.3 Å²) mit den Programmen SOLVE/RESOLVE (Terwilliger, 2000; Terwilliger & Berendzen, 1999) bestimmt werden. Damit erhielt man experimentelle Phasen bis 1.98 Å. Die asymmetrische Einheit enthält ein Molekül, entsprechend einem Matthews-Koeffizienten von 2.9 Å³/Da. 406 Reste der Peptidkette konnten mit RESOLVE vollständig modelliert werden, 49 Reste als Alanin. Daraus erhielt man ein R_{work} von 33 % und ein R_{free} von 37 %. Mit dem Modell aus RESOLVE wurden mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) 452 Reste interaktiv modelliert und mit REFMAC5 (Bailey, 1994) verfeinert ($R_{\text{work}}=29$ %, $R_{\text{free}}=32.4$ %). Schließlich wurde dieses Modell mit dem Programm ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1999) automatisch auf 505 Aminosäuren vervollständigt ($R_{\text{work}}=29$ %, $R_{\text{free}}=32.4$ %). Mit O konnten dann die Reste 112-622 modelliert und mit REFMAC5 verfeinert werden. Diese Prozedur wurde bis zu einem finalen R-Faktor von 11.9 % mehrfach wiederholt ($R_{\text{work}}=11.7$ %, $R_{\text{free}}=14.9$ %).

3. Untersuchungen am Tailspike Protein des Bakteriophagen HK620

3.1. Herstellung, Reinigung und biochemische Charakterisierung

3.1.1. Klonierung, Expression und Reinigung

HK620TSP wird durch das Gen 9 im Genom des Phagen HK620 kodiert (Clark *et al.*, 2001). Es kann unter Kontrolle des T7 Promotors heterolog in *E. coli* BL21(DE3) in hoher Konzentration überexprimiert werden. Die lösliche Fraktion des Zellysats zeigt in der SDS-PAGE eine deutliche Bande unterhalb 205 kDa, die sich nach Erhitzen der Probe auf 100 °C in den Bereich oberhalb 66 kDa verschiebt. Dies ist der erste unmittelbare Hinweis, dass es sich bei HK620TSP wie beim P22TSP um ein SDS-resistentes Oligomer handelt, das erst beim längeren Erhitzen in Gegenwart von SDS vollständig denaturiert werden kann (Abbildung 12). HK620TSP wurde daraufhin nach dem gleichen Protokoll gereinigt wie P22TSP und Sf6TSP (Freiberg *et al.*, 2003; Miller, 1995): Nach Zellyse und Ammoniumsulfatfällung wurden eine Ionenaustausch- und eine hydrophobe Interaktionschromatographie verwendet. Die Salzkonzentrationen bei der Elution variierten nur wenig verglichen mit beiden vorher beschriebenen Reinigungsprotokollen. Letzte Verunreinigungen wurden durch Größenausschlusschromatographie beseitigt. Pro Liter Bakterienkultur erhält man etwa 30 mg gereinigtes Protein. Wie in silbergefärbten SDS-Gelen gezeigt werden kann, hat das Protein eine Reinheit von mehr als 95 %. Es lässt sich auf ca. 15 mg/ml konzentrieren, fällt bei höheren Konzentrationen jedoch aus. Damit scheint HK620TSP aggregationsempfindlicher zu sein als die anderen beiden Tailspike Proteine, die sich bis auf 100 mg/ml konzentrieren lassen (U.Baxa, pers. Mitteilung). Sequenzhomologie zwischen HK620TSP, P22TSP und Sf6TSP besteht nur innerhalb der ersten 115 Aminosäuren. Fragmente des nicht sequenzhomologen β -helikalen C-Terminus der TSP sind enzymatisch aktive, SDS-resistente Trimere (Danner *et al.*, 1993; Freiberg, 2000; Miller *et al.*, 1998a). Im Gegensatz zum Volllängenprotein konnten sie kristallisiert werden. Zum

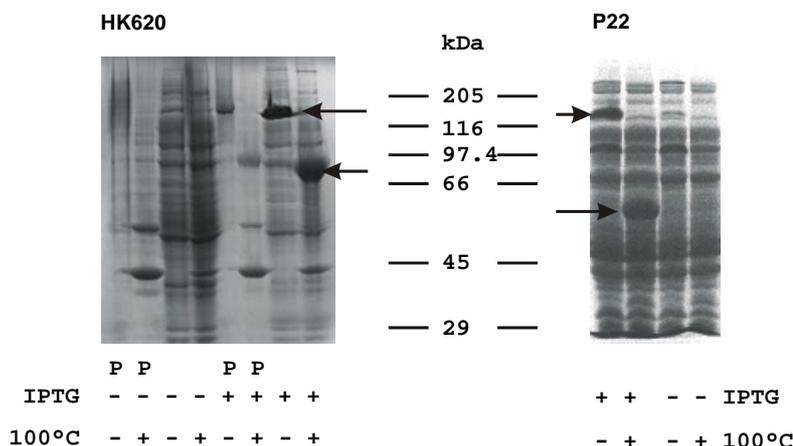


Abbildung 12. Expressionstests von HK620TSP und P22TSP in *E. coli* BL21(DE3). SDS-PAGE nach Zellyse von löslicher und unlöslicher Fraktion (P) vor (-) und nach (+) IPTG-Zugabe, mit (+) und ohne (-) Erhitzen auf 100°C für 5 min. Für P22TSP sind nur lösliche Fraktionen dargestellt.

Vergleich der Proteine untereinander und zum Kristallisieren sollte deshalb von HK620TSP ebenfalls ein C-terminales Fragment hergestellt werden.

In Übereinstimmung mit Experimenten mit limitierter Proteolyse (siehe Abschnitt 3.2.3.) wurde für ein C-terminales Fragment die Sequenz Asp¹¹⁰-Val⁷¹⁰ ausgewählt und das entsprechende Genfragment in einen pET-Vektor kloniert. Das Konstrukt ohne die N-terminale Kopfbindungsdomäne wird im Folgenden als HK620TSP Δ N bezeichnet. Es kann in vergleichbaren Ausbeuten wie der Wildtyp nach dem gleichen Reinigungsprotokoll hergestellt werden.

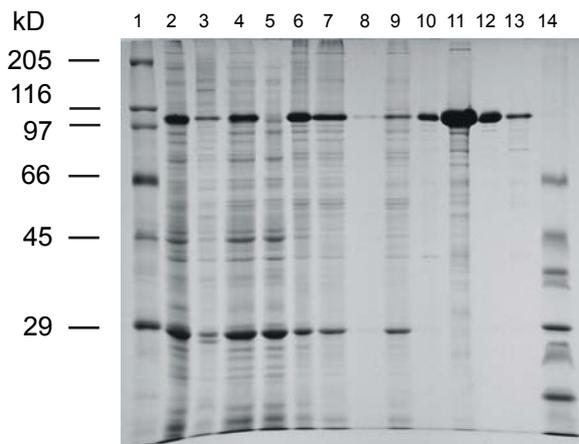


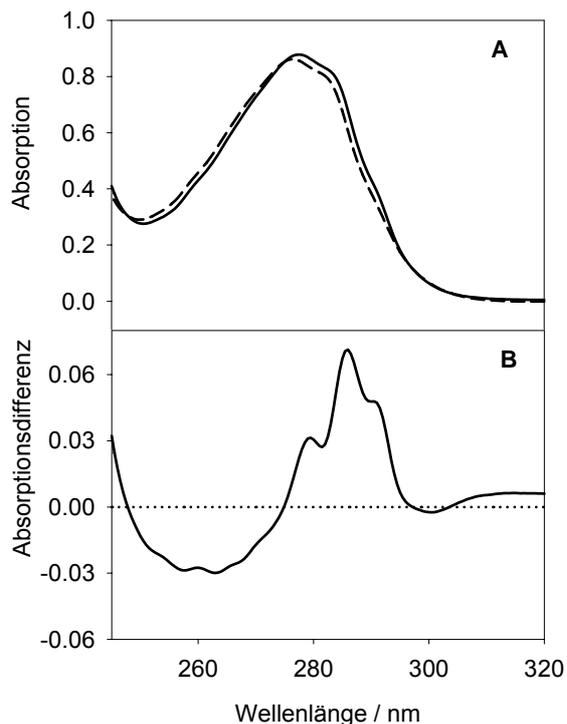
Abbildung 13

SDS-PAGE der Reinigungsschritte von HK620TSP Δ N. 1-5 μ g Protein/Spur, Coomassie-gefärbt.

(1, 14) Molekulargewichtsmarker.

- (2) Überstand nach French Press Aufschluss. (3) Unlösliche Fraktion.
- (4-7) Ammoniumsulfatfällung: Suspension, Überstand, Pellet, dialysiertes Pellet.
- (8, 9) Produkt nach Ionenaustauschchromatographie auf DE52 Cellulose.
- (10) Produkt nach hydrophober Interaktionschromatographie auf Phenylsepharose. (11) Nachreinigung durch Ionentausch auf Q-Sepharose.
- (12, 13) Produkt nach Gelfiltration auf Superdex 200.

3.1.2. Spektroskopische Eigenschaften



HK620TSP enthält 40 Tyrosin-, 7 Tryptophan- und 35 Phenylalaninreste, HK620TSP Δ N 32 Tyrosin-, 7 Tryptophan- und 30 Phenylalaninreste. Die spektralen Eigenschaften im sichtbaren und ultravioletten Licht werden hauptsächlich durch Tryptophanreste und durch die große Anzahl an Tyrosinresten bestimmt.

Abbildung 14.

Absorptionsspektren von HK620TSP (Schichtdicke 1 cm). (A) 10 μ M Protein, nativ (—) und denaturiert in 6 M GdmCl (---). (B) Differenzspektrum aus A. Die Form der Spektren für HK620TSP Δ N ist sehr ähnlich (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.1. Absorptionsspektren

Das Absorptionsspektrum von HK620TSP wird durch die hohe Anzahl von Tyrosinresten dominiert, die bei 276 nm ca. 60 % der molaren Extinktion verursachen (Pace & Schmid, 1997). Entsprechend liegt das Maximum für das in 6 M GdmCl entfaltete Protein bei 276.5 nm, fast im Maximum der Tyrosinabsorption (Abbildung 14). Im nativ gefalteten Protein verschiebt sich das Maximum zu 277.5 nm. Die Tryptophanabsorption ist bei 291 nm als eine Schulter zu erkennen. Eine weitere charakteristische Schulter befindet sich bei 284 nm. Unterhalb von 284 nm ist die Absorption des denaturierten Proteins geringfügig höher als die des nativen Proteins. Bei 286 nm ist die Differenz im Absorptionsspektrum zwischen denaturiertem und nativem Protein mit 0.07 Absorptionseinheiten am größten. Bei Proteinkonzentrationen im Bereich ab 300 µg/ml ermöglicht dies Untersuchungen zur Faltung und Entfaltung mittels UV-Spektroskopie.

3.1.2.2. Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzemissionsspektren bei 280 nm Anregung zeigen ein Maximum bei 336 nm. Das verkürzte Protein HK620TSP Δ N zeigt eine ca. 15 % höhere Fluoreszenzamplitude als der Wildtyp (Abbildung 15). Es ist unklar, welche Effekte diese 15 % Amplitudenzunahme verursachen. Die gleiche Amplitudenzunahme um ca. 15 % im Vergleich zum Volllängenprotein beobachtet man auch, wenn nur die Tryptophanreste bei 295 nm angeregt werden. Bei beiden Proteinen verringert sich die Amplitude um ca. 60 % gegenüber der Anregung bei 280 nm. Unter denaturierenden Bedingungen verschiebt sich bei 6 M GdmCl für HK620TSP und HK620TSP Δ N das Maximum der unkorrigierten Fluoreszenzspektren nach 361 nm. Dies ist durch lösungsmittlexponierte Trp-Reste im denaturierten Protein zu erklären (Abbildung 16, A und B). Bei Anregung der denaturierten Proteine bei 295 nm erhält man die gleiche Fluoreszenzamplitude wie für die nativen Proteine, was auf lösungsmittlexponierte Tryptophane hindeutet (Daten nicht gezeigt). Beim

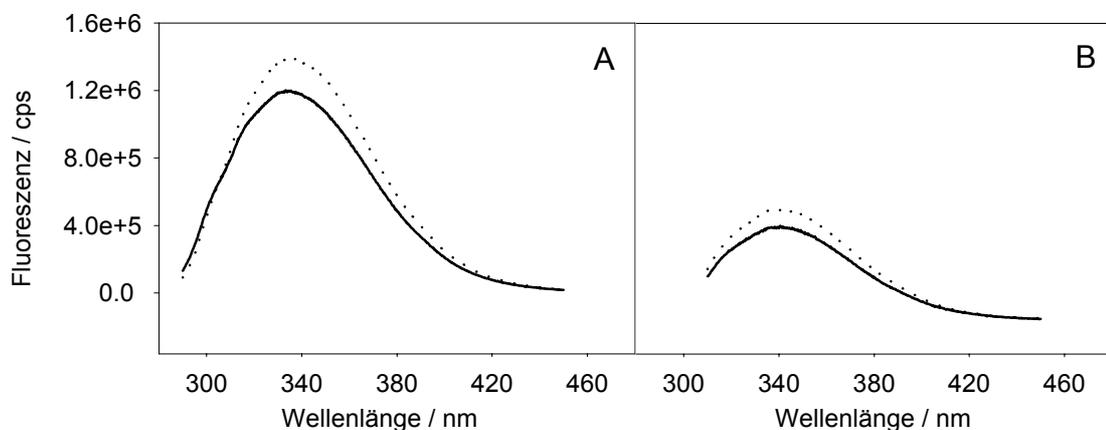


Abbildung 15

Fluoreszenzspektren von HK620TSP(-) und HK620TSP Δ N(---), nativ, 0.15 µM in 100 mM Natriumphosphat pH 7.6. (A) $\lambda_{\text{Ex}}=280$ nm. (B) $\lambda_{\text{Ex}}=295$ nm.

Denaturieren mit saurem Harnstoff erhält man dagegen nur teilweise entfaltete Proteine (Abbildung 16, C und D), eine Bande für Tyrosinfluoreszenz bei 305 nm ist im Gegensatz zur Denaturierung mit GdmHCl nicht erkennbar. Beim verkürzten Protein HK620TSPAN ändert sich die Fluoreszenzamplitude in saurem Harnstoff nicht, beim Wildtyp nimmt sie gegenüber dem nativen Protein um 25 % zu. Dies könnte auf die Entfaltung der N-terminalen Domäne im Wildtyp zurückzuführen sein. Die Fluoreszenzmaxima liegen bei 345 nm, was auf die Anwesenheit von lösungsmittelabgeschirmten Tryptophanen schließen lässt. Energietransfer von Tyrosin zu Tryptophan ist somit weiterhin möglich. Spektren, in denen mit 295 nm angeregt wurde, zeigen einen Amplitudenverlust von 46 % gegenüber den bei 280 nm angeregten Spektren (Daten nicht gezeigt), im Vergleich zum nativen Protein mit 60 % Amplitudenverlust bei Anregung bei 295 nm. HK620TSP lässt sich somit in 6 M Harnstoff bei pH 3 nicht vollständig denaturieren. Andererseits ist es nicht möglich, das Protein wieder zurückzufalten, wenn es unter diesen Bedingungen denaturiert wurde (Daten nicht gezeigt). Es bleibt zu untersuchen, in welchem Zustand das Protein in 6 M Harnstoff, pH 3, vorliegt, und ob z.B. pH-Wert-Variationen eine vollständige Denaturierung erreichen können. Grundsätzlich müsste das Denaturierungsverhalten der Tailspike Proteine in Harnstoff in Abhängigkeit vom pH-Wert noch näher un-

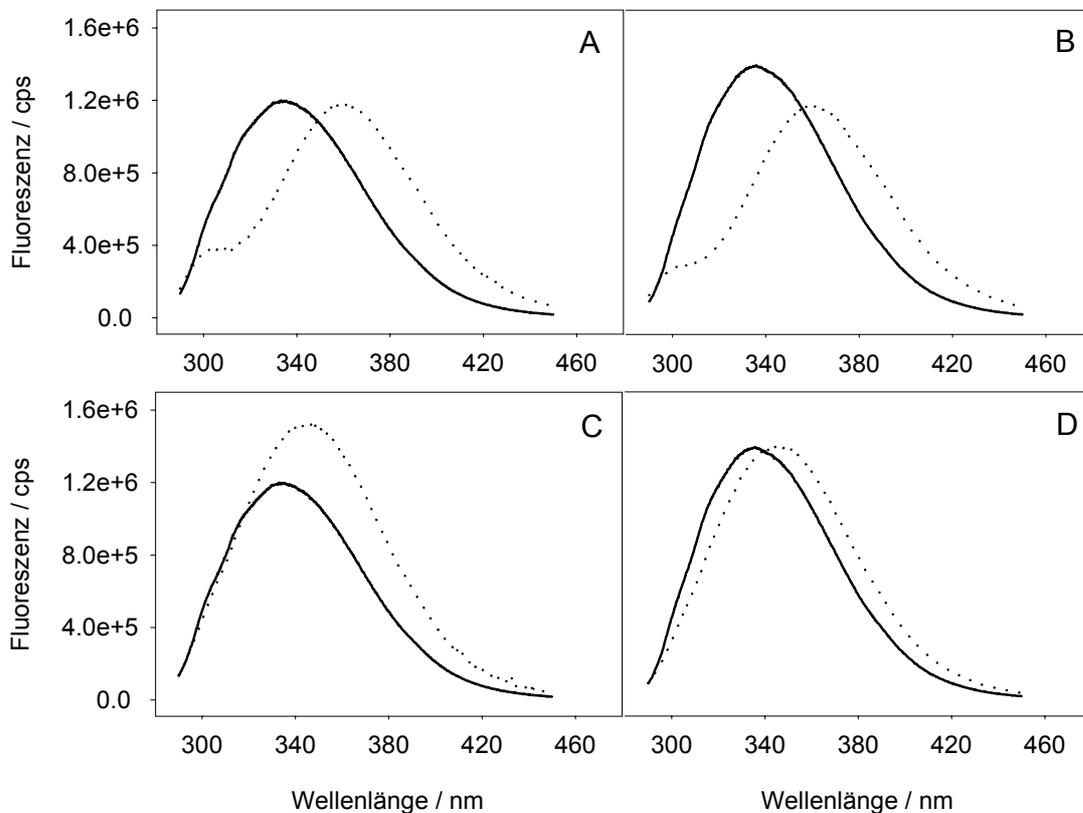


Abbildung 16

Fluoreszenzspektren von $0.15 \mu\text{M}$ HK620TSP und HK620TSPAN unter nativen (-) und denaturierenden (---) Bedingungen, $\lambda_{\text{EX}}=280 \text{ nm}$. A. HK620TSP, 6 M GdmCl. B. HK620TSPAN, 6 M GdmCl. C. HK620TSP, 6 M Harnstoff, pH 3. D. HK620TSPAN, 6 M Harnstoff, pH 3. Durchgezogene Linien zeigen die Spektren der nativen Proteine.

tersucht werden. Für Rückfaltungsuntersuchungen wurde P22TSP in 6 M Harnstoff bei pH 3 denaturiert und kann aus diesem Zustand zurückgefaltet werden (Seckler *et al.*, 1989). Bei Sf6TSP liegt das Fluoreszenzmaximum in 6 M Harnstoff pH 3 im Bereich für lösungsmittlexponierte Tryptophanreste bei 355 nm (Daten nicht gezeigt). Die Fluoreszenzamplitude in saurem Harnstoff ist dabei jedoch 25 % größer als die des nativen Proteins. Genau wie HK620TSP lässt sich aber auch Sf6TSP nicht zurückfalten, wenn es in saurem Harnstoff denaturiert wurde (D. Andres, persönliche Mitteilung). Die gleiche Beobachtung macht man auch bei Tailspike Protein des Bakteriophagen Det7 (Fiedler, 2005).

3.1.2.3. Nah-UV-CD-Spektren

Im Bereich von 350 bis 250 nm erhält man für HK620TSP das tertiärstrukturspezifische CD-Spektrum (Abbildung 17A). Die molare Elliptizität zeigt ein ausgeprägtes Minimum bei 291 nm, sowie ein weiteres Minimum bei 286 nm. Ein kleines Maximum liegt bei 287.5 nm. Das Hauptmaximum bei 270 nm wird vermutlich durch die 40 Tyrosinreste von HK620TSP dominiert. Im Vergleich zum P22TSP (19 Tyrosinreste) und Sf6TSP (26 Tyrosinreste) ist deshalb im Bereich unterhalb 280 nm weniger Feinstruktur erkennbar (Abbildung 17B). Vergleicht man im nahen UV die molaren Elliptizitäten, so ist die rund doppelt so große Amplitude des N-terminal verkürzten HK620TSP Δ N bei 270 nm im Vergleich zum Volllängenprotein auffällig (Abbildung 17A). Das Differenzspektrum lässt

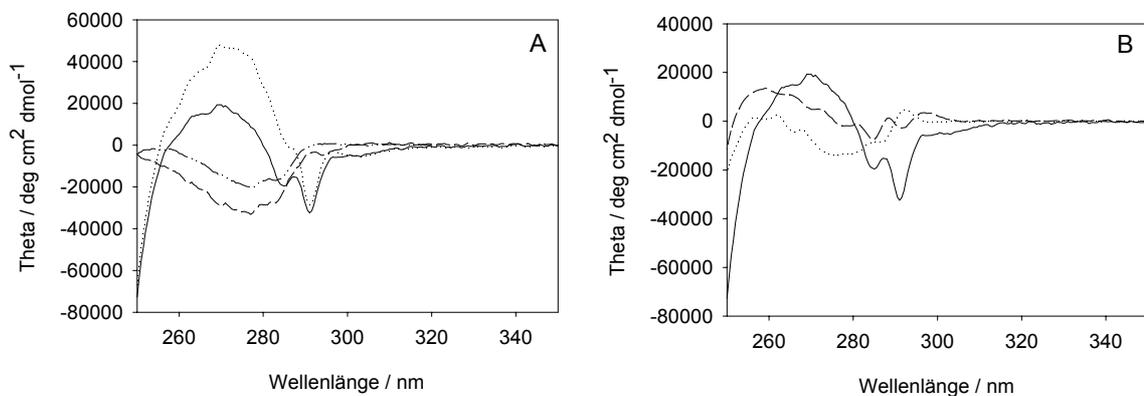


Abbildung 17.

Nah-UV-CD-Spektren von Tailspike Proteinen. (A) HK620TSP (-), HK620TSP Δ N (...) und HK620TSPNDStrep (-*-). Das Differenzspektrum zwischen verkürztem und Volllängenprotein ist als gestrichelte Linie dargestellt. (B) Vergleich von P22TSP(...), Sf6TSP(-*-) und HK620TSP (-).

somit auf einen negativen Beitrag der 8 Tyrosinreste der N-terminalen Domäne zum Spektrum des Wildtypproteins schließen. Zum Vergleich wurde die isolierte N-terminale Domäne von HK620TSP mit einem Streptavidintag versehen kloniert und gereinigt (Daten nicht gezeigt). Das Konstrukt HK620TSPNDStrep (Reste 1-123) zeigt eine ähnliche Spektrenform und negative Amplitude wie das Differenzspektrum aus HK620TSP und HK620TSP Δ N (Abbildung 17A). Der Betrag der Amplitude ist allerdings niedriger. Diese Abschwächung des Nah-UV-CD-Signals von HK620TSPNDStrep entsteht wahrscheinlich durch einen Tryptophanrest im N-terminalen Affinitätstag.

3.1.2.4. Fern-UV-CD-Spektren von HK620TSP

Im Fern-UV zeigt HK620TSP das typische CD-Spektrum für Proteine mit hohem Gehalt von β -Sekundärstrukturelementen (Abbildung 18A.). Man findet ein Maximum bei 200 nm. Auffällig ist die ausgeprägte Feinstruktur der Bande, die sich in mehreren Versuchen reproduzieren ließ und vermutlich nicht allein durch experimentelles Rauschen erklärt werden kann. Das Minimum liegt bei 220 nm und ist somit gegenüber den anderen

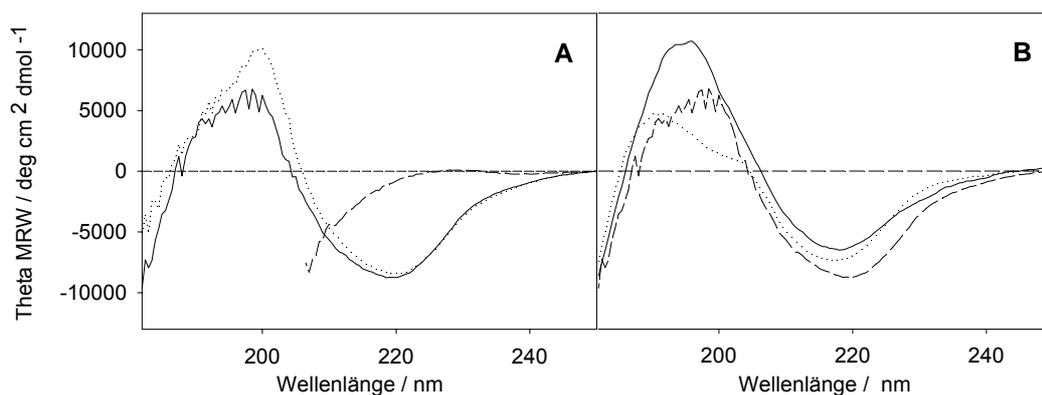


Abbildung 18.

Fern-UV-CD-Spektren. (A) HK620TSP (-) und HK620TSP Δ N (---) in 50 mM NaMOPS, pH 7. Die gestrichelte Linie zeigt das Spektrum einer denaturierten Probe von HK620TSP Δ N (6 M GdmCl). (B) Vergleich der drei Tailspikeproteine Sf6TSP (-), P22TSP (---) und HK620TSP (---).

Tailspike Proteinen leicht verschoben. Sf6TSP und P22TSP haben ein Minimum bei 219 nm (Abbildung 18B.). Mit dem GdmCl-denaturierten Protein erhält man das charakteristische *random coil* CD-Signal. Im Messbereich oberhalb von 180 nm kann aus dem Fern-UV-CD-Spektrum nicht auf die Anwesenheit einer parallelen β -Helix geschlossen werden. Allgemein haben parallele rechtsgängige β -Helices im Bereich bis 180 nm kein charakteristisches Fern-UV-Spektrum (Sieber *et al.*, 1995). Bei einer Ausweitung des Messbereichs mit Synchrotronstrahlung bis 160 nm könnte man jedoch in Zukunft ein signifikantes β -Helix-CD-Signal im fernen UV suchen (Wallace & Janes, 2001).

3.1.3. Fourier Transform Infrarotspektroskopie

Der Gehalt an Sekundärstruktur kann aus Fourier Transform Infrarotspektren abgeschätzt werden. Diese Methode ist bei hauptsächlich β -Faltblattstrukturen enthaltenden Proteinen meist zuverlässiger als die Analyse von Daten aus CD-Spektren (Pelton & McLean, 2000). Vergleichende Untersuchungen von mehreren β -helikalen Proteinen haben jedoch gezeigt, dass kein charakteristisches FT-IR-Spektrum für die parallele β -Helix existiert (Khurana & Fink, 2000). Der Sekundärstrukturgehalt wird in der Amid I Region des IR-Spektrums durch die symmetrische Carbonylstreckschwingung abgebildet (Jung, 2000). Die Spektren von HK620TSP und HK620TSP Δ N sind in der Lage der Amid I Bande identisch (Daten nicht gezeigt). Für HK620TSP findet man das Maximum bei 1638 cm^{-1} (Abbildung 19). Dies ist ein nötiger, aber nicht hinreichender Hinweis auf das

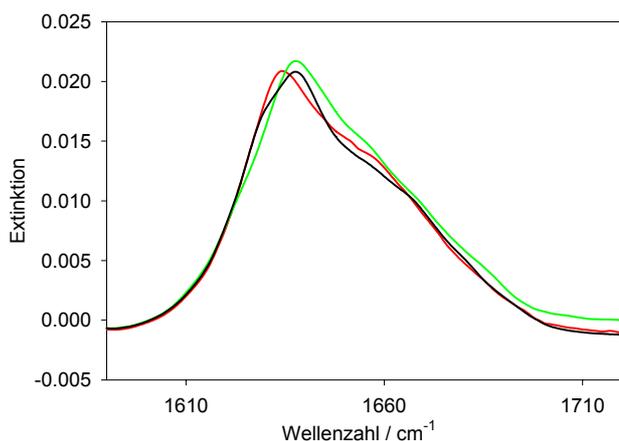


Abbildung 19.

Fourier-Transform Infrarotspektren von Tailspikeproteinen. Die Amid I Bande ist als Ausschnitt aus den seitenkettenkorrigierten Spektren gezeigt. HK620TSP (schwarz, ν_{\max} 1638 cm^{-1}). Daten für Sf6TSP (grün, ν_{\max} 1638 cm^{-1}) und P22TSP (rot, ν_{\max} 1634 cm^{-1}) aus (Freiberg *et al.*, 2003). Das abweichende Maximum von P22TSP ist durch unzureichenden H-D-Austausch in der Probe zu erklären (Freiberg *et al.*, 2003).

Amid I Bande als Summe von Voigt-Kurven darstellen lässt. Voigt-Kurven sind Gauss-ähnliche Kurven, von denen jede einzelne aufgrund ihrer spektralen Lage den Beitrag eines Sekundärstrukturelements darstellt (Jung, 2000). Der Fit von 10 Voigt-Banden an das Spektrum von HK620TSP ist in Abbildung 20 gezeigt. Aus FT-IR-Daten wird für HK620TSP nur etwa 23 % β -Faltblattstruktur vorhergesagt, im Gegensatz zu über 40 % beim P22TSP und Sf6TSP. Laut Vorhersage ist dafür bei HK620TSP der Anteil an α -helikaler, ungeordneter und 3_{10} -helikaler Struktur erhöht. Beim Fit der dekonvolutierten

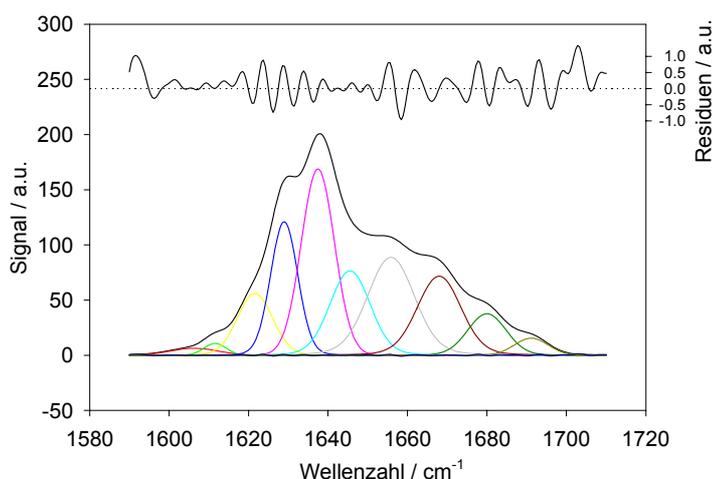


Abbildung 20.

Fit von 10 Voigt Banden in die Amid I Bande des FT-IR-Spektrums von HK620TSP. Es wurde das seitenkettenkorrigierte und dekonvolutierte Spektrum verwendet. Für die spektrale Lage der Banden siehe Tabelle 6.

Vorhandensein paralleler β -Faltblattstrukturen. Eine Schulter bei 1660 cm^{-1} deutet auf das Vorhandensein von *loop*-Strukturen hin (Khurana & Fink, 2000). Diese beiden Befunde stützen die Hypothese einer parallelen β -Helix als Supersekundärstrukturmotiv in HK620TSP. In spektraler Lage und Bandenform der Amid I Bande ähneln die FT-IR-Spektren von HK620TSP denen von Sf6TSP und P22TSP (Abbildung 19).

Die Spektren wurden deshalb quantitativ auf die Beiträge einzelner Sekundärstrukturelemente untersucht. Im verwendeten Modell wird dabei angenommen, dass sich die

Amid I Bande als Summe von Voigt-Kurven darstellen lässt. Voigt-Kurven sind Gauss-ähnliche Kurven, von denen jede einzelne aufgrund ihrer spektralen Lage den Beitrag eines Sekundärstrukturelements darstellt (Jung, 2000). Der Fit von 10 Voigt-Banden an das Spektrum von HK620TSP ist in Abbildung 20 gezeigt. Aus FT-IR-Daten wird für HK620TSP nur etwa 23 % β -Faltblattstruktur vorhergesagt, im Gegensatz zu über 40 % beim P22TSP und Sf6TSP. Laut Vorhersage ist dafür bei HK620TSP der Anteil an α -helikaler, ungeordneter und 3_{10} -helikaler Struktur erhöht. Beim Fit der dekonvolutierten Spektren wird der α -Helix-Anteil jedoch systematisch zu hoch eingeschätzt (Freiberg *et al.*, 2003; Jung, 2000). Dies wurde auch bei der FT-IR Analyse von Sf6TSP und P22TSP beobachtet. Der Anteil an *turn*-Bereichen in HK620TSP ist etwa so hoch wie im P22TSP (Tabelle 6). Grundsätzlich muss bei der quantitativen Auswertung von FT-IR-Spektren berücksichtigt werden, dass mit der Methode die Stärke von

Tabelle 6. Sekundärstrukturvorhersage nach Voigt (Jung, 2000) [4] aus FT-IR-Spektren von Tailspike Proteinen^a

	HK620TSP	HK620TSP Δ N	Sf6TSP	P22TSP
	$\nu / \text{cm}^{-1}, \% ^b$			
β	1612(1.0)	1612(1.5)	1611(1.9)	1611(2.5)
	1621(8.2)	1621(6.5)	1625(17.2)	1626(25.7)
	1629(13.7)	1629(14.7)	1636(21.6)	1635(17.8)
Ungeordnet/ 3_{10}	1637(23.0)	1638(26.1)	1642(12.1)	1643(8.4)
α	1646(13.1)	1647(11.8)	1646(5.4)	1649(5.7)
	1656(18.1)	1656(16.3)	1654(12.1)	1655(13.9)
<i>turn</i>	1668(13.5)	1668(13.2)	1666(22.4)	1667(21.0)
	1680(6.0)	1679(5.8)	1684(4.9)	1684(3.4)
	1691(2.1)	1690(2.6)	1700(1.6)	1694(0.9)
Total β -Faltblatt	22.9	22.7	40.9	46.2
Total α -Helix	31.2	28.1	17.1	19.6
Total <i>turn</i> /ungeordnet	44.6	47.7	41.0	33.6

^a Daten für Sf6TSP und P22TSP nach (Freiberg *et al.*, 2003).

^b Fit von 10 Voigt Banden in die Amid I Bande des dekonvolvierten, seitenkettenkorrigierten Spektrums. Angegeben sind die spektrale Lage und die Bandenfläche in %.

Wasserstoffbrücken (bei seitenkettenkorrigierten Spektren) des Peptidrückgrats gemessen wird. Dagegen steht die klassische Definition der Sekundärstruktur eines Proteins über die Winkelverhältnisse ϕ und ψ im Ramachandran-Plot (Iupac, 1970). In parallelen β -Helix-Proteinen beobachtet man in *turn*- und *loop*-Bereichen oft die gleichen regelmäßigen Bindungsmuster der Wasserstoffbrücken wie in den parallelen β -Faltblättern selbst. Günstiger wäre für einen die Vergleich die Berechnung der Sekundärstruktur aus der Kristallstruktur mit der HERA-Methode, die Wasserstoffbrücken berechnet (Hutchinson & Thornton, 1990). Beim Vergleich mit Kristallstrukturdaten wird deshalb der Gehalt an β -Faltblattstruktur aus FT-IR-Spektren zu hoch geschätzt (Khurana & Fink, 2000). Dies zeigt sich auch im P22TSP, wo rund 25 % mehr β -Struktur vorhergesagt werden als eigentlich vorhanden sind (Tabelle 7). Wäre dieser Trend auch für HK620TSP gültig, so bedeutet dies, dass der vorhergesagte Anteil von 23 % β -Struktur aus dem IR-Experiment in Wirklichkeit noch geringer ist. Dabei kann man ohne detaillierte Röntgenkristallstrukturdaten nur spekulieren, wie HK620TSP organisiert ist. Zum einen könnte das Protein eine kürzere β -Helix mit weniger *coils* ausbilden. Zum anderen könnten zusätzliche Domänen vorhanden sein, die einen geringeren oder gar keinen β -Anteil aufweisen. In Sf6TSP, mit weniger ausgeprägten *loop*-Bereichen in der β -Helix, stimmt dagegen die Vorhersage aus IR-Daten für den Anteil an β -Struktur besser mit den aus den Röntgenstrukturdaten ermittelten überein, allerdings ist der vorhergesagte Anteil an α -Struktur, genau wie im P22TSP, erhöht (Tabelle 7). Sowohl im P22TSP als auch im

Sf6TSP tragen zusätzlich die C-Termini zum Gesamtanteil an β -Struktur bei. Damit ist die Zuordnung von Sekundärstrukturelementen zu bestimmten Domänen von HK620TSP mittels FT-IR-Analyse nicht möglich, und das Vorhandensein einer parallelen β -Helix in HK620TSP kann nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 7. Vergleich von Sekundärstrukturanteilen aus Röntgenstrukturdaten für Tailspike Proteine mit Vorhersagen aus FT-IR-Spektren.

Strukturelement	P22TSP		Sf6TSP	
	X-ray ^{a,b} / %	FT-IR / %	X-ray ^b / %	FT-IR / %
β -Faltblatt	35.7	46.2	43.8	40.9
α -Helix	4.4	19.6	7	17.1
turn / loop	59.9	33.6	49.2	41.0

^a Daten aus (Freiberg *et al.*, 2003)

^b Ermittelt nach der Methode von Kabsch und Sander (Kabsch & Sander, 1983).

3.1.4. Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad des nativen Proteins

3.1.4.1. Größenausschlusschromatographie

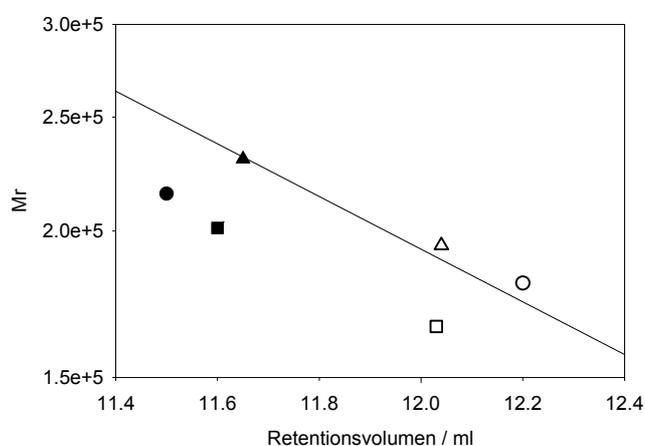


Abbildung 21.

Vergleich der Retentionsvolumina von Tailspike Proteinen in der Größenausschlusschromatographie. Stationäre Phase: Superdex 200 HR 10/30, mobile Phase 50 mM Natriumphosphat, pH 7. Die eingezeichnete Gerade zeigt die Abhängigkeit der Molekulargewichte vom Retentionsvolumen, die für die verwendete Säule mit globulären Standardproteinen ermittelt wurde (siehe Material und Methoden). Aufgetragen sind die theoretischen für trimere Tailspike Proteine berechneten Molekulargewichte (auf logarithmischer Skala): P22TSP (●), P22TSP Δ N (○), HK620TSP (▲), HK620TSP Δ N (△), Sf6TSP (■), Sf6TSP Δ N (□).

HK620TSP eluiert mit einem einzelnen Maximum in der Größenausschlusschromatographie (Daten nicht gezeigt). Für ein natives Trimer würde man eine Molekularmasse von 230 kD erwarten. Bereits beim P22TSP und beim Sf6TSP wurde gezeigt, dass sich die zur Kalibrierung der Gelfiltrationsmatrix verwendeten globulären Standards nicht eignen, um daraus die Molekularmasse der länglich geformten Tailspike Proteine zu berechnen (Freiberg *et al.*, 2003). P22TSP und Sf6TSP zeigen ein abweichendes Elutionsverhalten von der Gelfiltrationsmatrix und haben zu hohe apparente Molekulargewichte (Abbildung 21, Tabelle 8). Dagegen eluiert HK620TSP (230 kD) entsprechend einer apparenten Molekularmasse von 229 kD

Tabelle 8. Analytische Gelfiltration von Tailspike Proteinen auf Superdex 200 HR 10/30.

Tailspike	Elutionsvolumen / ml	M _{av.} (berechnet) ^a Trimer / kD	M _{app.} / kD (globulär) ^b	M _{app.} / kD (Tailspike) ^c
HK620TSP	11.65	230	229	200
HK620TSPΔN	12.04	194	187	178
P22TSP	11.50	215	248	225
P22TSPΔN	12.20	181	172	167
Sf6TSP	11.60	201	235	220
Sf6TSPΔN	12.03	166	188	194

^aAus Aminosäuresequenz berechnet.^bMit globulären Standardproteinen kalibriert.^cMit 4 anderen Tailspike Proteinen kalibriert.

und liegt mit dem theoretisch berechneten Wert auf der Eichgerade von globulären Proteinen. Es handelt sich somit bei HK620TSP um ein natives Trimer. Die verkürzte Form HK620TSPΔN (194 kD) zeigt dagegen ein abweichendes Elutionsverhalten. Aus der Gelfiltration erhält man mit 187 kD eine zu niedrige Molekularmasse. Eine Möglichkeit, die längliche Form der Tailspike Proteine in die Molekularmassenbestimmung über Größenausschlusschromatographie mit einzubeziehen wäre, die Säule mit jeweils anderen Tailspike Proteinen bekannten Oligomerisierungsgrades zu kalibrieren. Wählt man jeweils vier andere Tailspikes für die Eichgerade aus und berechnet damit die Molekularmasse eines Proteins, so führt dies jedoch nicht zu einer genaueren Molekularmassenbestimmung (Tabelle 8).

3.1.4.2. Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe von HK620TSP und HK620TSPΔN wurden mit dem Programm SEDFIT (Schuck, 2000) ausgewertet. Die Verteilung der Sedimentationskoeffizienten wurde dabei unabhängig voneinander mit zwei *direct boundary modelling* Methoden ermittelt. Dabei erhält man zum einen die Verteilung $g^*(s)$ ohne Diffusionskorrektur, zum anderen die Verteilung $c(s)$ unter Berücksichtigung der Diffusion. Der Vergleich der Maxima von $g^*(s)$ und $c(s)$ ist ein Maß für die Güte des Fits von $c(s)$. Aus $c(s)$

Tabelle 9. Molekularmassen von Tailspike Proteinen aus Analytischer Ultrazentrifugation

	HK620TSP	HK620TSPΔN
M berechnet / kD	230	184
M _{app.} Sedimentationsgleichgewicht / kD	195	180
M _{app.} Sedimentationsgeschwindigkeit / kD	239	194

kann die Verteilung $c(M)$ berechnet werden und somit die Molekularmasse der sedimentierenden Spezies. Für HK620TSP ergibt sich eine apparente Molekularmasse von 239 kD (berechnet 230 kD), für HK620TSPΔN 184 kD (berechnet 194 kD). In die aus den Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen ermittelten Molekularmassen geht je-

doch bei der Umrechnung von $c(s)$ nach $c(M)$ der bereits gewichtsgemittelte Formfaktor fff_o ein, so dass die Molekularmassen nicht korrekt angegeben werden können. Dies ist vermutlich der Grund für die um etwa 10 kD zu hoch bestimmten apparenten Molekularmassen von HK620TSP und HK620TSP Δ N.

Aus den Sedimentationskoeffizienten der Geschwindigkeitsläufe wurden in dieser Arbeit mithilfe des Programms SEDNTERP (Lebowitz *et al.*, 2002) Oligomerisierungsgrad und Form der Proteine abgeschätzt. Dabei werden die auf 20°C und Wasser korrigierten experimentellen Sedimentationskoeffizienten $s_{20,w}^O$ mit den s_{max} für ideal kugelförmige Partikel verschiedener Oligomere verglichen. Dabei ergibt sich für die Annahme, dass Tailspike Proteine als Dimere vorliegen ein mit dem experimentellen $s_{20,w}^O$ von 9.63 S (Δ N 9.14 S) vergleichbarer Sedimentationskoeffizient s_{max} von 10.64 S (Δ N 9.57 S). Allerdings sind die experimentell bestimmten Werte für $s_{app.}$ in Puffer höher und das Verhältnis der Reibungskoeffizienten fff_o liegt nahe eins. Dies ist für eher längliche Tailspike Proteine unwahrscheinlich. Dagegen erhält man für trimere Spezies ein fff_o von ca. 1.4, was auf eine längliche Form hindeutet. Mit den in das Programm SEDNTERP implementierten Algorithmen zur hydrodynamischen Modellierung können für längliche Rotationsellipsoide von Proteinen Durchmesser und Länge bestimmt werden. Man erhält für das hydratisierte HK620TSP eine Länge von ca. 280 Å, für HK620TSP Δ N von ca. 235 Å. Diese Längendifferenz ist in guter Übereinstimmung mit den Dimensionen der N-terminalen Domäne vom P22TSP, die entlang der Trimerachse ca. 35-40 Å misst. Der Durchmesser von verkürztem und Vollängenprotein ist mit ca. 53 Å gleich. Nach der hydrodynamischen

Tabelle 10. Analytische Ultrazentrifugation von HK620TSP und HK620TSP Δ N, Analyse mit dem Programm SEDNTERP (Lebowitz *et al.*, 2002)^{3]} von apparenten Sedimentationskoeffizienten aus dem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment (10 mM Natriumphosphat, pH 7, 25 °C).

	HK620TSP	HK620TSP Δ N
$s_{app.} / S$	10.76	10.15
$s_{20,w}^O / S$	9.63	9.14
s_{max}^b Monomer / S	6.70	6.03
s_{max}^b Dimer / S	10.64	9.57
s_{max}^b Trimer / S	13.94	12.54
fff_o Monomer	0.70	0.66
fff_o Dimer	1.10	1.05
fff_o Trimer	1.45	1.37
Rotationsellipsoid a/b	5.34	4.46
2a / Å	281.1	235.0
2b / Å	52.7	52.7
Anteil Hydrathülle / %	13.1	13.8

^a Korrigiert auf unendliche Proteinverdünnung, 20°C und Wasser.

^b Idealer Sedimentationskoeffizient für kugelförmige Partikel.

^c Verhältnis von experimentellem zu idealem Reibungskoeffizienten, $fff_o = s_{max} / s_{20,w}^O$.

schen Abschätzung scheint HK620TSP damit länger als die anderen beiden Tailspike Proteine zu sein. Diese Hypothese könnte in Vergleichsläufen für die Sedimentationsgeschwindigkeit vom P22TSP und Sf6TSP überprüft werden.

Zur weiteren Bestätigung des trimeren Oligomerisierungsgrades und zur Molekularmassenbestimmung wurden außerdem Sedimentationsgleichgewichtsläufe beider Proteine bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm MStar (Helmut Cölfen). Während dabei die Molekularmasse M_{app} von 180 kD gut mit der berechneten für HK620TSP Δ N (berechnet 184 kD) übereinstimmt, wird für HK620TSP mit 195 kD eine zu niedrige Molekularmasse bestimmt, vermutlich, weil die Proben stark aggregiert waren. Die ermittelten Molekularmassen bestätigen das Ergebnis, dass es sich bei HK620TSP um ein natives Trimer handelt.

3.1.4.3. SDS-PAGE

Analog zu Sf6TSP und P22TSP beobachtet man auch bei HK620TSP in der SDS-PAGE ein abweichendes Laufverhalten. Wenn Proben in Gegenwart von 2 % SDS ohne

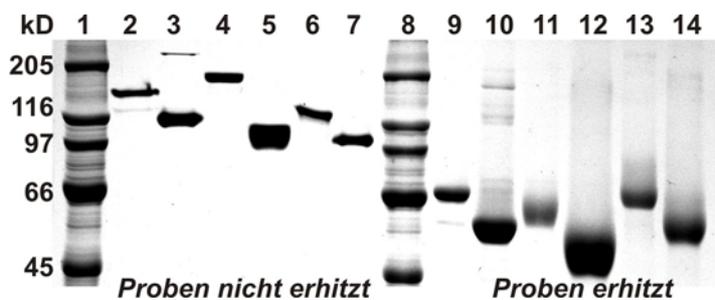


Abbildung 22.

Vergleich von Tailspikeproteinen in der SDS-PAGE. Je Spur wurde 1 μ g Protein aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Die Proben in Spur 9-14 wurden vor dem Auftrag 10 min auf 100 °C erhitzt. (1,8) Molekulargewichtsmarker. (2,9) P22TSP. (3,10) P22TSP Δ N. (4,11) Sf6TSP. (5,12) Sf6TSP Δ N. (6,13) HK620TSP. (7,14) HK620TSP Δ N.

vorheriges Erhitzen aufgetragen werden, erhält man Banden bei einer apparenten Molekularmasse von 125 kD (HK620TSP) bzw. 110 kD (HK620TSP Δ N). Tailspike Proteine binden fast gar kein SDS (R.Seckler, pers. Mitteilung). Sie wandern in der SDS-PAGE nur aufgrund ihrer Eigenladung. Entsprechend wandern die Moleküle schneller als bei einer Größe von 230 kD zu erwarten

wäre. Erst nach dem Kochen für 10 Minuten bei 100 °C denaturiert HK620TSP vollständig und man findet Banden bei ca. 70 kD (HK620TSP) bzw. 50 kD (HK620TSP Δ N), den erwarteten Molekularmassen für monomere Proteine. Im Vergleich zu P22TSP und Sf6TSP migrieren die trimeren Spezies von HK620TSP im Gel am schnellsten, obwohl sie die größte Masse der drei Tailspike Proteine haben.

3.2. Stabilitätsuntersuchungen an HK620TSP

Die Tailspike Proteine weisen eine hohe Stabilität gegen Detergenzien, Temperatur und Denaturierungsmittel auf. Der native Zustand ist dabei kinetisch stabilisiert. Man erhält keine Daten zur thermodynamischen Stabilität aus der Denaturierung mit Chaotropen oder der thermischen Denaturierung, weil Faltung und Entfaltung nicht reversibel sind. Beim P22TSP tritt im De- und Renaturierungsübergang eine Hysterese auf, bei der thermischen Denaturierung bilden sich Aggregate (Fuchs *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1998b). Deshalb misst man die Geschwindigkeiten der Denaturierung, um ein Maß für die Stabilität zu erhalten. Denaturierungskinetiken sind ein Maß für die Stabilitätsdifferenz zwischen nativem Zustand und dem Übergangszustand des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Denaturierung. Aus solchen Messungen ergeben sich allgemein für sehr stabile Proteine theoretische Halbwertszeiten von teilweise über 200 Jahren

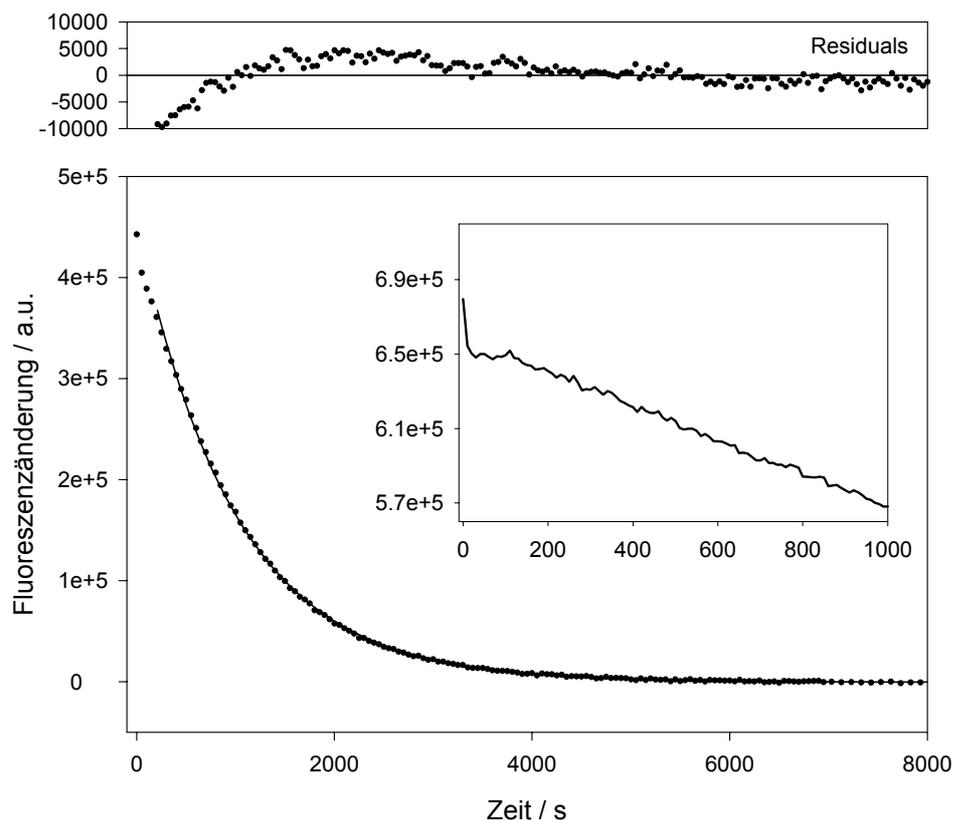


Abbildung 23.

Denaturierungskinetik von 10 $\mu\text{g/ml}$ HK620TSP in 7.29M GdmCl bei 20°C, gemessen als Abnahme des nativen Fluoreszenzsignals bei 320 nm. Die Fluoreszenzintensitäten wurden für die Abnahme durch *photobleach* korrigiert. Die gesamte Amplitude der Entfaltung wird erfasst (Kontrollen nicht gezeigt). Aus dem monoexponentiellen Fit (durchgezogene Linie) ohne *lag*-Phase erhält man $k=1.01 \cdot 10^{-3} \text{s}^{-1}$. Der Einschub zeigt die *lag*-Phase der Entfaltung, wegen der besseren zeitlichen Auflösung ist ein Ausschnitt aus einer Kinetik unter gleichen Bedingungen bei 6.79 M GdmCl gezeigt. Die Amplitude ist nicht maßstäblich zur Kinetik bei 7.29 M GdmCl. Wie in einer Serie von Mischexperimenten bei unterschiedlichen GdmHCl-Konzentrationen gezeigt wurde rührt der Amplitudensprung zu Beginn vom Mischen her (Daten nicht gezeigt).

(Manning & Colon, 2004). Daraus folgt, dass messbare Denaturierungsgeschwindigkeiten nur in Gegenwart von Denaturierungsmitteln erzielt werden. Für Tailspike Proteine misst man dabei zum einen thermische Denaturierungskinetiken in Gegenwart von SDS (Miller *et al.*, 1998b), zum anderen Denaturierungskinetiken in Gegenwart von hohen Konzentrationen an GdmCl (Freiberg, 2000).

3.2.1. Denaturierungskinetiken in Gegenwart von GdmCl

HK620TSP ist sehr stabil gegen Chaotrope. In Harnstoff verläuft die Denaturierung, bezogen auf die Messung der Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit von Tryptophanresten mittels Fluoreszenz, selbst bei pH 3 nicht vollständig (siehe Abschnitt 3.1.2.2.). Beim Denaturieren in hohen Konzentrationen von GdmCl beobachtet man nach dem manuellen Mischen zunächst eine *lag*-Phase von ca. 200 s. Die *lag*-Phase tritt auch beim verkürzten Protein auf (Daten nicht gezeigt). Danach beginnt die Abnahme des nativen Fluoreszenzsignals (Abbildung 23). Die Kinetiken der Denaturierung von HK620TSP und HK620TSP Δ N lassen sich als monoexponentielle Funktion beschreiben, für die Kurvenanpassung ohne *lag*-Phase wurden die Datenpunkte ab 200 s verwendet. Aus Messungen bei verschiedenen GdmCl Konzentrationen wurde auf die Entfaltungsrate des nativen Proteins bei 0 M GdmCl extrapoliert (Abbildung 24). Die mit dieser Metho-

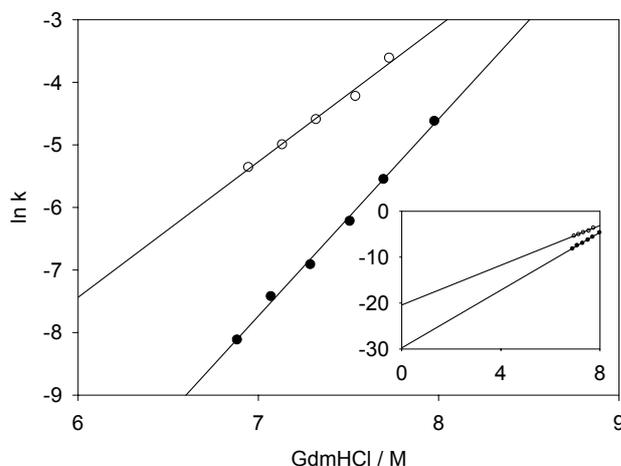


Abbildung 24.

Denaturierungskinetiken bei 20 °C von HK620TSP (●) und HK620TSP Δ N (○) in GdmCl. Aus der Extrapolation der logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten auf 0 M GdmCl (Einschub) erhält man für das native Protein $k=1.18 \cdot 10^{-13} \text{ s}^{-1}$ (WT) bzw. $k=1.33 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ (Δ N).

de erhaltenen Werte von $k = 1.18 \cdot 10^{-13} \text{ s}^{-1}$ (WT) und $k = 1.33 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ (Δ N) entsprechen sicher nicht der Realität und sind nur für Vergleiche von bestimmten Proteinen untereinander verwendbar. Bei HK620TSP läuft bei Konzentrationen unterhalb 6.5 M GdmCl die Denaturierung schon so langsam, dass während des Rührens in der Küvette über Zeiträume von mehr als 12 h Aggregate entstehen (Daten nicht gezeigt). In den Messungen zeigt sich, dass die Entfernung der N-terminalen Domäne zu einer Destabilisierung des Proteins führt. Die Denaturierung von HK620TSP Δ N ist im Vergleich zum Wildtyp um das Siebenfache beschleunigt. Die Halbwertszeiten der Denaturierung betragen z.B. in 7.5 M GdmCl 5.8 min (WT) bzw. 0.8 min (Δ N). Dies wurde auch beim P22TSP Δ N beobachtet, wo die Denaturierung zehnfach beschleunigt ist (Miller, 1995). Bei Sf6TSP Δ N dagegen tritt dieser Effekt nicht auf (Freiberg, 2000). Die N-terminale Domäne von Sf6TSP besitzt ver-

mutlich weniger stabilisierende Wechselwirkungen mit dem übrigen Protein als die N-terminalen Domänen von HK620TSP und P22TSP. Sie ist auch nicht SDS- und proteaseresistent (Freiberg *et al.*, 2003) (siehe Abschnitt 4.2.1.1.). Insgesamt zeigt das Experiment jedoch die hohe kinetische Stabilität der Tailspike Proteine.

3.2.2. Differentielle Scanning Kalorimetrie

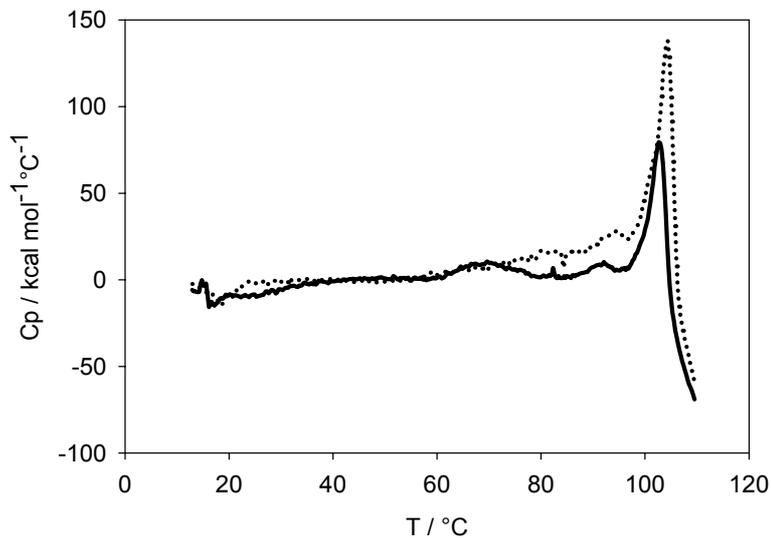


Abbildung 25. Differentielle Scanning Kalorimetrie von HK620TSP (-) und HK620TSP Δ N (...) in 10 mM Natriumphosphat pH 7 bei einer Aufheizrate von 1 K/min. Aus den Heizkurven wurde T_m wegen der starken Aggregation lediglich abgeschätzt zu 102.7 °C (HK620TSP) bzw. zu 104.4 °C (HK620TSP Δ N).

Der Schmelzpunkt von HK620TSP wurde mittels differentieller Scanning Kalorimetrie (DSC) untersucht (Abbildung 25). Die Denaturierung geht jedoch mit starker Aggregation einher, und der Aufheizprozess ist komplett irreversibel. Ein zweites Aufheizen zeigt kein ΔC_p mehr (Daten nicht gezeigt). Aus den Heizkurven wurde deshalb lediglich T_m abgeschätzt. HK620TSP und HK620TSP Δ N denaturieren bei einem T_m von 102.7 °C bzw. 104.4 °C. Die Aufheizexperimente wurden für jedes Protein nur einmal durchgeführt. Unterschiede im T_m von Vollängenprotein und verkürzter Form sind deshalb nicht interpretierbar. Wegen der starken Aggregation des Proteins wurde in dieser Arbeit auf einen weiteren Einsatz der DSC als Methode zur Charakterisierung der Thermostabilität von HK620TSP verzichtet.

3.2.3. Analyse von Thermostabilität und Proteaseresistenz mittels SDS-PAGE

Eine andere Möglichkeit, die thermische Denaturierung des Proteins zu verfolgen, ist die SDS-Gelelektrophorese. Die trimeren, SDS-resistenten Moleküle zeigen ein von monomeren, denaturierten Ketten unterscheidbares Laufverhalten (siehe Abschnitt 3.1.3.3.). Erhitzt man eine Probe von HK620TSP für unterschiedliche Zeiten in Nativpuffer auf 90 °C, so ist das Protein erst nach mehr als vier Stunden vollständig denaturiert (Abbildung 26A, Endpunkt der Denaturierung nicht gezeigt). Beim Denaturieren tritt ein SDS-resistentes, trimeres Intermediat auf, das im Gel langsamer migriert als das native Protein. Im Hinblick auf weitere Versuche zur Proteaseresistenz von nativem Protein und thermischem Entfaltungsintermediat wurden dem thermischen Denaturierungsansatz zunächst keine Detergenzien zugesetzt. Auf diese Weise konnte analog zu den Kalori-

metrieexperimenten die Aggregation der denaturierten Ketten beobachtet werden, messbar als Abnahme der Bandenintensität im Coomassie-gefärbten Gel (Abbildung 26B). Die während des thermischen Denaturierens entstehenden Aggregate sind unlöslich und adherieren an das Reaktionsgefäß. Die Proteinkonzentration im Ansatz nimmt so mit der Zeit ab, und auf Aliquots auf dem SDS-Gel sind nur trimere, lösliche Spezies detektierbar (Abbildung 26A), jedoch keine Monomerbande, die von vollständig denaturiertem Protein herrührt. Dabei ändert sich über einen Zeitraum von 2 h bei 90 °C das Verhältnis der Konzentrationen von nativer Spezies und Intermediat nicht, was darauf hindeuten könnte, dass sie sich im Gleichgewicht befinden.

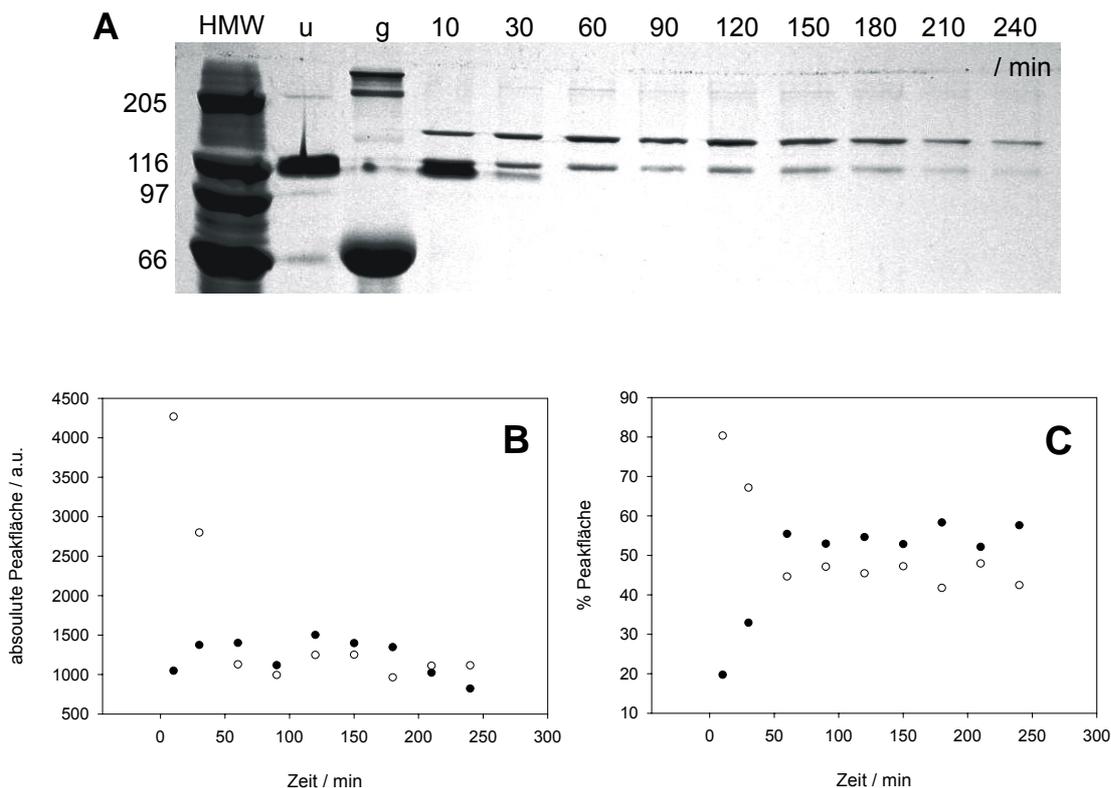


Abbildung 26.

Denaturierung von HK620TSP (1 mg/ml in 50 mM NaMOPS, pH 7) bei 90 °C ohne Detergenzien.

A. Zeitlicher Verlauf in der SDS-PAGE. (HMW) Markerbanden in kD, (u) ungekochte Kontrolle, (g) gekochte Kontrolle.

B. Densitometrische Auswertung des Coomassie-gefärbten Gels aus A, Proteinmengen nativ (O) und Intermediat (●) als absolute Peakflächen.

C. Prozentuales Verhältnis von nativem Protein und Intermediat.

HK620TSP ist ein proteaseresistentes Protein. Bei Inkubation über Nacht bei RT mit Trypsin bleibt das Protein im SDS-Gel nativ (Abbildung 27A). Auch gegen kurzzeitige Inkubationen zwischen 55 °C und 75 °C und anschließende Trypsinbehandlung ist HK620TSP resistent (Abbildung 27A). Dies gilt auch, wenn Chymotrypsin verwendet wird (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde zunächst bei 90 °C das thermische Denaturierungsintermediat (siehe Abbildung 26A) 60 min lang populiert und anschließend für unterschiedliche Zeiten mit Trypsin bei RT verdaut. Dabei entsteht ein trimeres, gegenüber dem nativen Protein verkürztes Produkt (Abbildung 27B).

Die Fragmente aus der limitierten Proteolyse wurden durch tryptischen In-Gel-Verdau und MALDI-MS *peptide mapping* charakterisiert. Für das trimere, proteolytische Fragment von HK620TSP wurden keine N-terminalen Peptide aus dem Sequenzabschnitt 1-108 gefunden (Tabelle 11). Dagegen konnten im *peptide map* des nicht prozessierten Proteins alle Fragmente des Sequenzabschnitts 22-108 identifiziert werden. Das N-terminale Peptid 1-21 wird nicht gefunden. Ab Tyr¹⁰⁹ sind die Peptidfragmentmuster für prozessiertes und nicht prozessiertes Protein identisch (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich in HK620TSP wie im P22TSP die Kopfbindedomäne nach Lys¹⁰⁸ tryptisch abspalten, sie ist im thermisch populierbaren Intermediat entfaltet. Dies bewirkt auch das verlangsamte Laufverhalten des Intermediats in der SDS-PAGE.

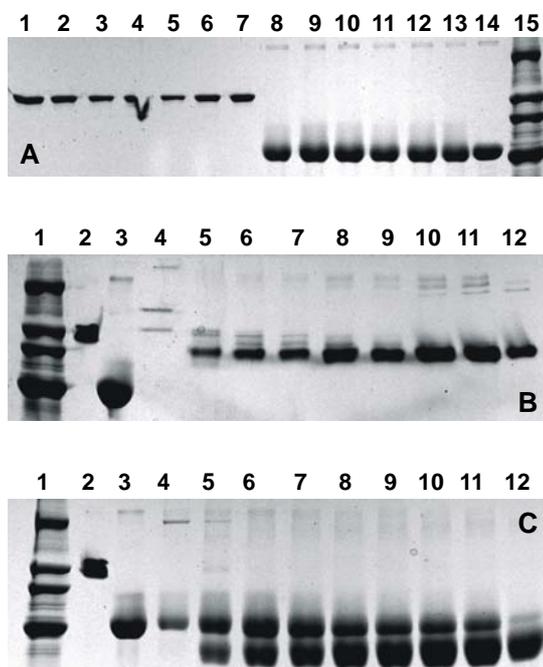


Abbildung 27.

SDS-PAGE (10 % Lämmli, Coomassiegefärbt) von HK620TSP (1 mg/ml) in 50 mM NaMOPS, pH 7.2.

A. ÜN Behandlung mit Trypsin, Inkubation der Proben (1) bei RT, (2) 60 min bei 55 °C, (3) 45 min bei 60 °C, (4) 30 min bei 65 °C, (5) 15 min bei 70 °C (6) 5 min bei 75 °C. (7) unverdaute Kontrolle. (8-14) wie (1-7), 10 min auf 100 °C erhitzt. (15) Marker, wie in Abbildung 26A.

B. Populieren des Intermediats bei 90 °C für 60 min mit anschließendem Trypsinverdau. (1) Marker, (2) nicht erhitzte Kontrolle, (3) erhitzte Kontrolle (4) 0 min, (5) 1 min, (6) 5 min, (7) 10 min, (8) 30 min, (9) 60 min, (10) 120 min, (11) 240 min, (12) ÜN.

C. Wie B, Proben (4-12) 10 min auf 100 °C erhitzt.

Interessanterweise beobachtet man mit zunehmenden Zeiten des Trypsinverdau der bei 90 °C inkubierten Probe eine Zunahme von löslichem Protein (Abbildung 27B,C, Spuren 5-12). Dies könnte darauf hindeuten, dass Spezies mit nicht nativ gefaltetem N-Terminus nur wenig löslich sind, durch Abspaltung der ersten 108 Aminosäuren aber wieder in Lösung gebracht werden können. Dies würde auch die starke Abnahme der absoluten Proteinkonzentration innerhalb der ersten 30 Minuten des Erhitzens auf 90 °C erklären (Abbildung 26B). Ob in der Lösung ein konzentrationsabhängiges Gleichgewicht von nativer Spezies und Intermediat vorliegt oder ob lediglich limitierend wirkt, dass teilweise entfaltete Spezies an die Wand des Reaktionsgefäßes binden, ist unklar. Im Vergleich zum P22TSP und Sf6TSP weist HK620TSP somit eine noch höhere Thermostabilität auf. In der limitierten Proteolyse findet man für HK620TSP und P22TSP die gleiche Domänengrenze der N-terminalen Kopfbindedomäne. Dies rechtfertigt die Klonierungsstrategie für ein N-terminal verkürztes Fragment HK620TSP Δ N ab Asp¹¹⁰ in Analogie zum P22TSP Δ N, das ebenfalls mit Asp¹¹⁰ beginnt (Steinbacher *et al.*, 1994). Entsprechend zeigt

Tabelle 11. MALDI-MS *peptide mapping* von nativem und mit Trypsin prozessiertem HK620TSP. Nur die N-terminalen Peptide des Sequenzabschnitts 1-115 sind gezeigt.

Peptid ^a	$[M+H]^+$ _{calc.} ^b / Da	$[M+H]^+$ _{exp.} HK620TSP unverdaut / Da	$[M+H]^+$ _{exp.} HK620TSP verdaut / Da
22 -30	921.5	921.5	-
31 -46	1844.0	1844.0	-
36 -46	1269.6	1269.7	-
47 -81	3782.9	3784.2	-
82 -108	3080.5	3082.8	-
82 -115	4001.9	4004.1	-
109 -115	940.42	940.4	940.4

^a Aminosäuresequenz aus HK620TSP, das N-terminale Peptid 1-21 ist nicht detektierbar.

^b Monoisotopische Masse.

ten Kontrollexperimente mit dem gentechnisch verkürzten HK620TSP Δ N keine Spaltung in der limitierten Proteolyse mit Trypsin (Daten nicht gezeigt). Das proteaseresistente Fragment P22TSP Δ N wurde erfolgreich in Kristallisationsexperimenten eingesetzt. HK620TSP Δ N kristallisiert dagegen nur langsam und nicht reproduzierbar (siehe Abschnitt 3.3.1.). Experimente mit Proteasen anderer Spezifität als Trypsin müssten durchgeführt werden um zu prüfen, ob noch andere Fragmente herzustellen sind, die sich besser kristallisieren lassen. Ferner besteht die Möglichkeit, dass in HK620TSP weitere thermische Entfaltungsintermediate mit variierendem Laufverhalten in der SDS-PAGE erzeugt werden können, wenn man für kurze Zeit (5-10 min) auf höhere Temperaturen (100 °C) erhitzt. Dies wurde mehrfach für unvollständig erhitzte Kontrollen beobachtet, die eine weitere Bande bei 205 kD aufweisen (Abbildung 26 und 27). Die gleichen langsam migrierenden Intermediate sind auch als Hybride unterschiedlich verkürzter trimerer Spezies im Trypsinverdau sichtbar (Abbildung 27B). Nach dem Verdau entstehen jedoch keine heterogenen Produktgemische. Dies deutet auf ähnliche Proteaseresistenz der unterschiedlichen Intermediate gegenüber Trypsin hin. Andere Proteasen müssten noch untersucht werden. Allgemein stellen die Thermostabilität und Proteaseresistenz von HK620TSP zwar keinen Beweis für das Vorhandensein einer parallelen β -Helix dar, sind im Vergleich zum P22TSP und Sf6TSP aber auch kein Widerspruch dazu.

3.2.4. Kinetiken der thermischen Denaturierung in Gegenwart von SDS

Kinetiken der thermischen Denaturierung von Tailspike Proteinen in Gegenwart von SDS stellen eine gute Möglichkeit dar, ohne störende Aggregationseffekte quantifizierbare Daten zur Stabilität zu erhalten. Die Proben werden in der SDS-PAGE analysiert, in der trimere SDS-resistente Entfaltungssintermediate mit quasinativen Laufverhalten von denaturiertem Protein unterschieden werden können (Abbildung 28). Für P22TSP wurde die Methode zum Stabilitätsvergleich von Punktmutanten optimiert (Miller *et al.*, 1998b). Unter gleichen experimentellen Bedingungen lässt sich auch

HK620TSP unter Auftreten des in Abschnitt 3.2.3. beschriebenen Intermediats entfalten (Abbildung 28). Bei 72 °C in Gegenwart von 2 % SDS ist die Entfaltung nach 6 Stunden vollständig (Daten nicht gezeigt). Dabei wird zunächst der N-Terminus entfaltet und das Intermediat populiert, das dann zum Monomer denaturiert. Die Denaturierung kann als Modell konsekutiver Reaktionen 1. Ordnung beschrieben werden:



Der zweite Schritt kann dabei als Maß für die Stabilität der nicht mit den anderen Tailspike Proteinen sequenzhomologen Domänen von HK620TSP verwendet werden. Eine genauere Beschreibung der Daten für die Abnahme nativer trimerer Spezies erhielt man unter der Annahme, dass natives Trimer und Intermediat im Gleichgewicht vorliegen (Abbildung 29A). Deshalb wurde ein abgewandeltes Modell für konsekutive Reaktionen 1. Ordnung mit einem reversiblen Schritt verwendet:



Bei 72 °C liegt das Gleichgewicht jedoch weit auf der Seite des Intermediats (Tabelle 12). Ein Modell rein konsekutiver Reaktionen stellt den Grenzfall eines vollständig zum In-

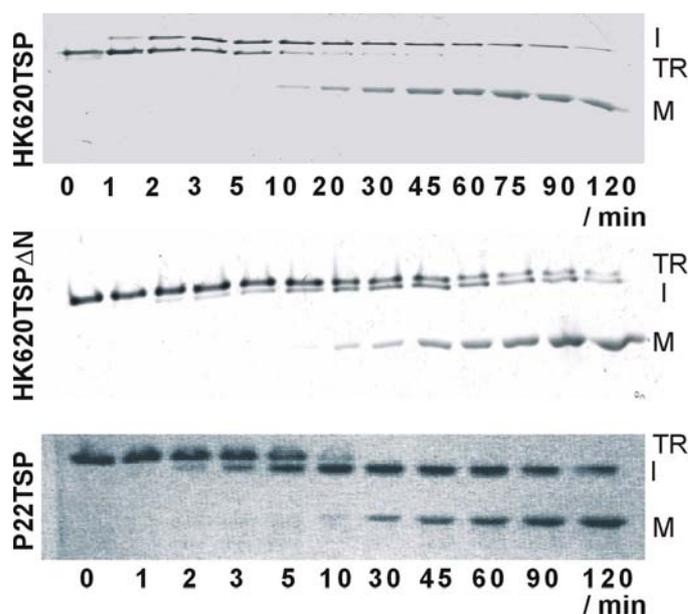


Abbildung 28.

Thermische Denaturierung von Tailspikeproteinen bei 72 °C in Gegenwart von 2 % SDS. SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt. Je Spur wurden 0.5 ng Protein aufgetragen. Die Bandenpositionen von Trimer (TR), Intermediat (I) und Monomer (M) sind markiert.

Tabelle 12. Geschwindigkeitskonstanten der thermischen Denaturierung in Gegenwart von 2% SDS.

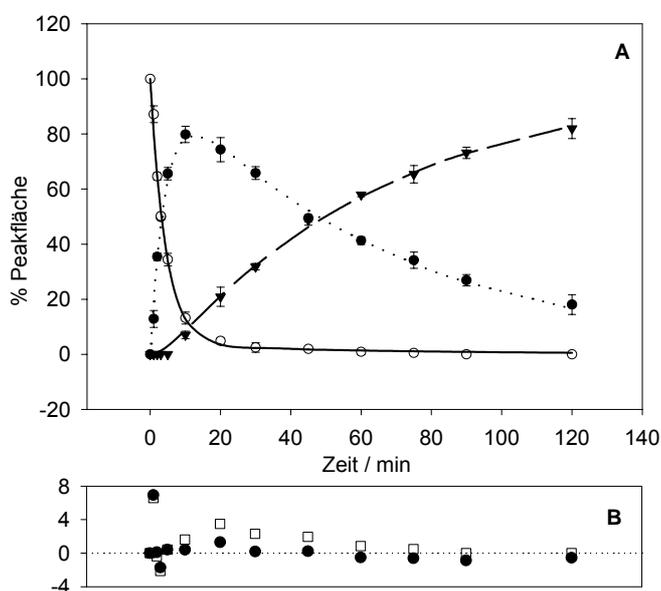
	k_1 / k_{hin}^a / 10^3 min	k_{rue}^b / 10^3 min	k_2 / k_{den}^c / 10^3 min
<i>Modell Trimer → Intermediat → Monomer (konsekutiv)</i>			
HK620TSP	215.89	-	15.71
HK620TSP Δ N	21.81	-	34.26
<i>Modell Trimer \rightleftharpoons Intermediat → Monomer (konsekutiv mit Gleichgewicht)</i>			
HK620TSP	221.22	6.78	15.80
HK620TSP Δ N	22.37	1.26	34.14
<i>Intermediat → Monomer (monoexponentieller Fit der Monomerzunahme)</i>			
HK620TSP	-	-	15.20
HK620TSP Δ N	-	-	10.00

^a k_1 : Trimer → Intermediat (konsekutiv), k_{hin} : Trimer → Intermediat (Hinreaktion bei Gleichgewicht).

^b k_{rue} : Intermediat → Trimer (Rückreaktion bei Gleichgewicht).

^c Denaturierungsschritt Intermediat → Monomer im rein konsekutiven (k_2) und im Gleichgewichtsmodell (k_{den}).

termediat verschobenen Gleichgewichts dar. Unter den gewählten Bedingungen nähert man sich bei HK620TSP bereits diesem Grenzfall. Entsprechend ergab sich für den Denaturierungsschritt zum Monomer in beiden Modellen kein Unterschied in der Entfaltungsrates, sie betrug ca. 0.016 pro Minute bei 72 °C (Tabelle 12). Ein Gleichgewicht zwischen nativer Spezies und Intermediat könnte auch die für die anderen Tailspike Proteine diskutierte *lag* Phase erklären. Sie wurde für P22TSP bei 72 °C als Aufheizphase während der ersten ca. 120 s beschrieben. Hier liegt noch kein Monomer vor, sondern es bildet sich eine in der SDS-PAGE nicht von nativem Trimer N unterscheidbare Spezies N*. In HK620TSP

**Abbildung 29.**

Thermische Denaturierung von HK620TSP bei 72 °C und 2 % SDS. Densitometrische Auswertung der SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung (siehe Abbildung 28). **A.** Prozentuale Anteile an Trimer (O), Monomer (▼) und Intermediat (●). Fehlerbalken für Standardabweichungen der Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die durchgezogenen Linien stellen den Fit der Daten nach dem Modell Trimer \rightleftharpoons Intermediat → Monomer (konsekutive Reaktionen 1. Ordnung mit einem reversiblen Schritt) dar.

B. Residuen bezogen auf das Trimer (●). Zum Vergleich sind die Residuen eines Fits der gleichen Daten nach dem Modell Trimer → Intermediat → Monomer (konsekutive Reaktionen 1. Ordnung) eingezeichnet (□).

dauert diese *lag* Phase mehr als 300 s. In dieser Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen nativem Protein und Intermediat ein, und es entstehen nur densitometrisch nicht messbare Konzentrationen an Monomer. Beim P22TSP ist diese Gleichgewichtseinstellung dagegen vermutlich zu schnell und wird experimentell wegen der sehr kleinen Konzentrationsunterschiede am Anfang der Reaktion nicht erfasst; wahrscheinlich spielen dabei auch die unterschiedlichen Färbeintensitäten von Trimer, Intermediat und Monomer eine Rolle. Zu den Beobachtungen passt, dass Sf6TSP keine *lag* Phase zeigt, da der N-Terminus bereits bei Raumtemperatur entfaltet und kein Intermediat vorliegt.

Auch bei HK620TSP Δ N tritt bei der thermischen Denaturierung ein in der SDS-PAGE trimeres Intermediat auf, das nur wenig unterhalb der nativen Bande läuft (Abbildung 28). Es reagiert bei 72 °C ca. fünfmal langsamer zur nativen Spezies zurück, denaturiert aber doppelt so schnell wie das Entfaltungsintermediat des Volllängenproteins (Tabelle 12). Bei höheren Temperaturen, wie sie zur Populierung von proteaselabilen Spezies in der limitierten Proteolyse verwendet wurden (siehe Abschnitt 3.2.3.) tritt dieses Intermediat jedoch nicht mehr auf, vielleicht weil es in Abwesenheit von SDS nicht löslich ist. Dieses Entfaltungsintermediat könnte durch weitere Experimente bei 72 °C mit limitierter Proteolyse eventuell näher charakterisiert werden. Da die Entfaltungsintermediate von HK620TSP und HK620TSP Δ N unterschiedliche Stabilität aufweisen, wurde zum Stabilitätsvergleich der zwei Proteine nur die Geschwindigkeit der Monomerenbildung herangezogen (Tabelle 13). HK620TSP Δ N ist etwa 30 % stabiler als das Volllängenprotein mit entfaltetem N-Terminus, vermutlich aber nur, weil es unter den gewählten Reaktionsbedingungen (72 °C, 2 % SDS) ein weiteres, stabileres Entfaltungsintermediat populiert.

Vergleicht man die Stabilitäten der drei Tailspike Proteine in der thermischen Denaturierung, so entfalten die N-Termini wesentlich schneller als die C-Termini. Bei Sf6TSP liegt der N-Terminus bereits bei Raumtemperatur in Gegenwart von SDS entfaltet vor. Im vorliegenden Experiment tritt deshalb kein Entfaltungsintermediat auf (Freiberg *et al.*, 2003). P22TSP entfaltet wie HK620TSP in diesem Experiment sequentiell zuerst die Kopfbindedomäne und dann den C-Terminus. Es entsteht ebenfalls ein SDS-resistentes trimeres Intermediat, das weiter zum Monomer denaturiert (Chen & King, 1991; Danner *et al.*, 1993). Bei P22TSP und HK620TSP verläuft die Entfaltung der N-Termini ähnlich schnell

Tabelle 13. Halbwertszeiten der Entfaltung von Tailspike Proteinen in Gegenwart von 2% SDS bei 72°C.

	N-Terminus / min	C-Terminus / min	$\Delta\Delta G^\ddagger$, ^a / kJ mol ⁻¹
Sf6TSP	-	21 ^b	1.48
P22TSP	2.9 ^b	12.7 ^c	0
HK620TSP	3.2	44.1	3.56

^a bezogen auf P22TSP, $\Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln(k_{\text{Protein}}/k_{\text{P22TSP}})$.

^b (Freiberg, 2000)

^c Alexander Freiberg, pers. Mitteilung.

(Tabelle 12). HK620TSP verhält sich somit wie P22TSP, allerdings ist seine C-terminale Domäne mehr als dreimal stabiler.

Es handelt sich demnach bei HK620TSP um das in diesem Experiment stabilste Protein, wenn man als Maß die Lage der Übergangszustände der Entfaltung annimmt (Tabelle 13).

Für P22TSP wurde jedoch gezeigt, dass die Stabilität von Entfaltungsintermediaten bereits durch Punktmutationen beeinflussbar ist (Miller *et al.*, 1998b). Allein aus ähnlichen Stabilitäten der C-terminalen Domänen der Tailspike Proteine kann darum nicht auf das Vorhandensein von bestimmten Domänenstrukturen in HK620TSP, wie z.B. einer parallelen β -Helix, zweifelsfrei geschlossen werden.

3.3. Kristallisation und Röntgenbeugungsexperimente

Kristallisationsversuche wurden mit der verkürzten Variante HK620TSP Δ N unternommen. Versuche mit Sf6TSP und P22TSP haben gezeigt, dass sie als Vollängenproteine nicht kristallisiert werden konnten (Freiberg *et al.*, 2003) oder keine das Röntgenstrahlung beugenden Kristalle ergeben (Miller *et al.*, 1998b). Dagegen erhielt man mit P22TSP Δ N und Sf6TSP Δ N geeignete Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse der Proteine. Datenaufnahme und Phasierungsversuche für Kristalle von HK620TSP Δ N wurden in Kooperation mit Dr. Jürgen Müller in der Abteilung für Kristallographie am Max-Delbrück-Zentrum Berlin-Buch durchgeführt.

3.3.1. Kristallisation, Datenaufnahme und Phasierungsversuche mit HK620TSP Δ N

Kristallisationsbedingungen für das N-terminal verkürzte Protein wurden zunächst mit einem Hampton Screen (siehe Material und Methoden) und der Methode des hängenden Tropfens gesucht. Dabei erhielt man beim ersten Versuch nach ca. 2 Wochen in einer ungepufferten wässrigen Lösung von 30 % PEG 1500 hexagonal zylindrische Kristalle der Raumgruppe P321 von etwa 50 μ m Kantenlänge (Abbildung 30A). Einer dieser

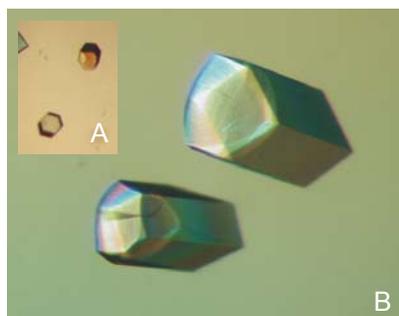


Abbildung 30.

Kristalle von HK620TSP Δ N, Raumgruppe P321. (A) Initiale Kristallisationsbedingung: 30 % PEG 1500, pH 3 aus kommerziellem Kit, Wachstumsdauer 2 Wochen, Kantenlänge ca. 50 μ m, nicht reproduzierbar. (B) 10 % PEG 1500, pH 3, Kantenlänge ca. 375 μ m, Wachstumsdauer ca. 4 Monate, nicht reproduzierbar.

Kristalle beugte Synchrotronstrahlung bis 1.95 \AA Auflösung, jedoch war die Mosaizität mit 0.75 $^\circ$ doppelt so hoch wie gewöhnlich. Um größere Kristalle zu erhalten, wurde im Folgenden die PEG-Konzentration zwischen 10 % und 30 % variiert. Allerdings waren nach 2 Wochen lediglich Kristalle in den Ansätzen gewachsen, die die original von der Firma Hampton gelieferte PEG-Lösung enthielten. Diese Kristalle waren mit 25 μ m Kantenlänge zu klein für ein Röntgenbeugungsexperiment. In den übrigen Ansätzen erhielt man erst nach ca. 4 Monaten große Kristalle mit Kantenlängen von bis zu 375 μ m (Abbildung 30B). Mit diesen Kristallen wurde im Folgenden ein nativer Datensatz bis 1.38 \AA Auflösung aufgenommen (Tabelle 14), ferner wurden sie für die Herstellung von Schweratomderivaten mittels Diffusion (*soaking*) benutzt. Die Kristallisationsbedingungen waren

nicht reproduzierbar. Es lassen sich jedoch allgemeine Beobachtungen zur Kristallisation von HK620TSP machen:

- Das Protein kristallisiert aus ungepufferten Lösungen mit niedriger Ionenstärke in einem pH-Bereich von 3.8-4.2. Der pH-Wert der PEG-Lösungen wird mit Salzsäure eingestellt. Die Temperatur beträgt 20 °C. Der Zusatz an Puffersalzen in Konzentrationen von bis zu 100 mM führt zu amorphen Präzipitaten.
- Die Proteinkonzentration sollte 2-4 mg/ml im hängenden Tropfen betragen, die Tropfengröße ist bei einem Volumen von 6 µl optimal. Bei höheren Proteinkonzentrationen bilden sich Präzipitate.
- Unter den hier verwendeten Bedingungen ist offenbar die Anzahl der Kristallisationskeime niedrig. Kristalle wachsen aber auch aus mikrokristallinen Präzipitaten. Verunreinigungen im Tropfen, z.B. Fusseln, dienen ebenfalls als Kristallisationskeim. Seeding-Versuche (Mikro- und Makro seeding) blieben ohne Erfolg.

Eine Phasierung der Daten mittels molekularem Ersatz war nicht möglich (J.Müller, persönliche Mitteilung). Dies ist aufgrund der geringen Sequenzübereinstimmung von HK620TSP mit P22TSP und Sf6TSP nicht verwunderlich und machte es erforderlich, experimentelle Phasen zu bestimmen.

3.3.2. *Phasierungsversuche mit HK620TSPANMet(Se) und Schwermetallerivaten*

3.3.2.1. *Herstellung und Kristallisation von HK620TSPANMet(Se)*

Zum Ermitteln der Phase in einem Röntgenbeugungsexperiment kann man die Tatsache ausnutzen, dass Schweratome bei Benutzung von Röntgenstrahlung einer Wellenlänge nahe der Absorptionskante dieses Schweratoms eine Phasenverzögerung bewirken (Müller & Heinemann, 2005). Im Kristall erhält man so anomale Streuer, und man bezeichnet diesen Effekt als anomale Dispersion. Als Schweratom kann z.B. Selen über die nichtnatürliche Aminosäure Selenomethionin inkorporiert werden. Im Röntgenabsorptionsspektrum liegt die K-Kante der Selenabsorption bei 12.6578 keV (Bearden & Burr, 1967) (<http://www.bmsc.washington.edu/scatter/data/Se.html>). Die korrespondierenden Messwellenlänge von 0.9795 Å ist in Röntgenbeugungsexperimenten mit Synchrotronstrahlung routinemäßig zugänglich. Von HK620TSPAN wurde deshalb eine Selenomethioninmutante, im folgenden als HK620TSPANMet(Se) bezeichnet, hergestellt. Die Methode ist in der Literatur beschrieben (Budisa *et al.*, 1995). Sie beruht auf der Expression des gewünschten Gens in methioninauxotrophen *E. coli* Zellen im Minimalmedium unter Zusatz von Selenomethionin. Die Reinigung des resultierenden Proteins erfolgt wie beim Wildtyp. Dabei arbeitet man wegen der hohen Oxidationsempfindlichkeit in Gegenwart von Reduktionsmitteln in allen Puffern. Auf diese Weise können entsprechend

Tabelle 14. Nativer Datensatz von HK620TSP Δ N, ID14-EH2/ESRF (Grenoble)

Wellenlänge / Å	0.933
Raumgruppe	P321
Auflösung / Å	1.38
Gemessene Reflexe	522 007
Unabhängige Reflexe	115 675
$\langle I/\sigma(I) \rangle^a$	12.7 (5.1)
Redundanz ^a	4.6 (4.0)
Vollständigkeit / % ^a	97.5 (90.2)
Mosaizität / ° ^a	0.36
Zellkonstanten a, c / Å	74.22 / 175.16
R _{sym} / % ^a	6.4 (26.3)
Matthews Koeffizient / Da Å ⁻³	2.16
Moleküle in der asymmetrischen Einheit	1
Volumen d. Einheitszelle / Å ³	839000
Lösungsmittelgehalt / %	42.7
Anzahl Aminosäuren	601
Molekulargewicht / Da	64796

^a Wert für die letzte Auflösungsschale (1.38-1.46 Å) in Klammern, ^b $R_{\text{sym}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$.

11 Methioninresten im Protein 11 Selenatome eingeführt werden. Unter den Kristallisationsbedingungen, die für das nicht mutierte Protein zu gelegentlichem Erfolg führten, konnten für HK620TSP Δ NMet(Se) jedoch keine Kristalle erhalten werden. Auffällig war, dass sich bei der Mutante bei 20 °C schon innerhalb weniger Tage Präzipitate bildeten, die im Gegensatz zu den beim Wildtyp beobachteten Präzipitaten amorph waren. Bei 4 °, 10 ° und 15 °C präzipitierte das Protein dagegen nur gelegentlich. Bei 4 °C wurden plättchenförmige, sechseckige Kristalle erhalten, die jedoch mit weniger als 50 µm Kantenlänge zu klein für ein Beugungsexperiment waren. Diese Experimente deuten darauf hin, dass die große Zahl von 11 Selenomethioninresten insgesamt stark destabilisierend auf das Protein wirken könnte.

3.3.2.2. Herstellung von Schwermetallderivaten von HK620TSP Δ N, Datenaufnahme, Phasierungsversuche

Binden Proteine im Kristall an definierten Bindestellen Schwermetallionen oder -verbindungen so können diese Schweratome mit der Patterson-Methode in der Elektrodichte lokalisiert werden und zur Phasierung dienen (Glusker *et al.*, 1994). Schwermetallderivate erhält man durch Eindiffundieren der Verbindungen in die intakten Kristalle („soaking“) oder durch Kokristallisation. Bei HK620TSP Δ N waren die Kristallisationsbedingungen für das native Protein nicht reproduzierbar. Meistens kristallisierte das Protein erst nach mehreren Monaten und nur aus Lösungen geringer Ionenstärke. Deshalb wurden keine Kokristallisationsversuche von Protein in Gegenwart von Metallsalzen unternommen, sondern nur *soaking* Experimente durchgeführt.

Dafür mussten die Kristalle, die meistens bei PEG 1500-Konzentrationen von 10-15 % gewachsen waren, zunächst sukzessive und über mehrere Tage langsam in höhere PEG-Konzentrationen umgesetzt werden, um Kryobedingungen für das Röntgenbeu-

gungsexperiment herzustellen. Beim letzten Umsetzen wurden dann Metallsalzlösungen zugesetzt und die Kristalle anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. *soaking* Experimente mit verschiedenen Metallsalzen wurden durchgeführt, bis alle vorhandenen Kristalle von HK620TSP verbraucht waren (siehe Material und Methoden). Von drei Kristallen konnten Datensätze gesammelt werden (Daten nicht gezeigt). Bei zwei mit Quecksilberacetat gesoakten Proben konnten Pattersonkarten mit Koordinaten für zwei Quecksilberionen erhalten werden. Diese Information reichte jedoch zur Phasenbestimmung nicht aus (J.Müller, persönliche Mitteilung). Ein mit Samariumacetat gesoakter Kristall sollte außerdem für ein SAD-Experiment (*single anomalous dispersion*) im Röntgenlabor verwendet werden. Cu-K α -1-Röntgenstrahlung von einer Rotationsdrehanode erzeugt ein ausreichend anomales Signal, falls Samarium gebunden wird. Allerdings gilt für anomale Streuer das Friedel'sche Gesetz nicht und es müssen mehr Intensitätsdaten gesammelt werden (Glusker *et al.*, 1994). Während der daraus resultierenden langen Messzeit (mehrere Tage) am Diffraktometer mit Drehanode wurde der Kristall jedoch zerstört.

3.4. Biologische Aktivität von HK620TSP

Die natürliche Funktion der Tailspike Proteine der Phagen P22 und Sf6 aus der Klasse der *Podoviridae* ist die Erkennung der Wirtszelle über das O-Antigen des äußeren Lipopolysaccharids. Der Phage HK620 wurde vergesellschaftet mit seinem Wirt *E. coli* H TD2158 isoliert (Dhillon *et al.*, 1998). Der Rezeptor des Phagen auf der Zelloberfläche ist bislang nicht charakterisiert worden. In Analogie zu den Phagen P22 und Sf6 wurde in

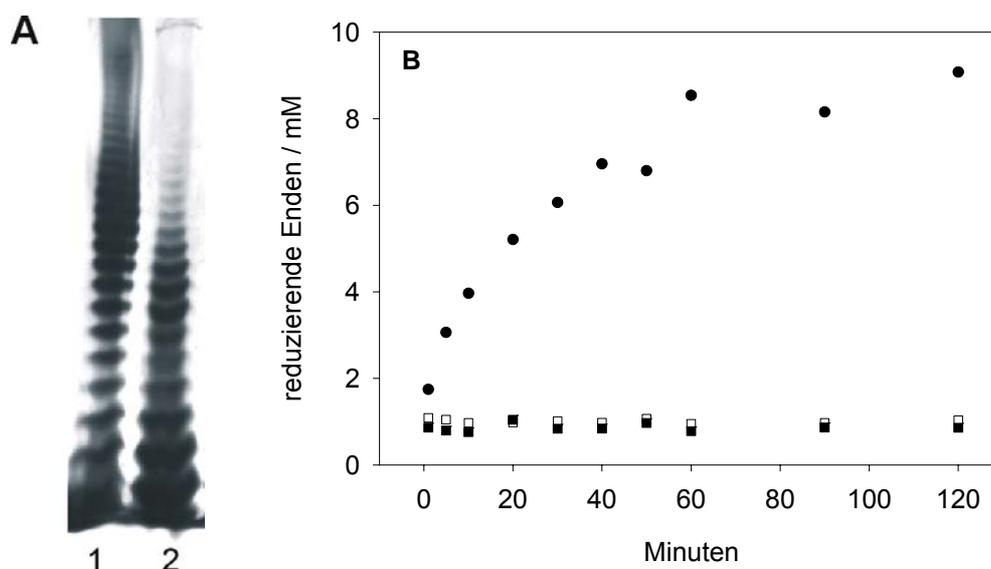


Abbildung 31.

Hydrolyse von *E. coli* H LPS (30 mg/ml) durch HK620TSP (50 μ g/ml), 50 mM Tris, pH 7, 1 mM NaEDTA bei 37°C. (A) SDS-PAGE (15% Lämmli, silbergefärbt) von 10 μ g LPS vor (Spur 1) und nach (Spur 2) Verdau mit HK620TSP (2 h). (B) Zeitlicher Verlauf der Entstehung reduzierender Enden im Dinitrosalicylsäuretest mit 50 μ g/ml HK620TSP (●), 50 μ g/ml BSA (□) und ohne Protein (□).

dieser Arbeit die *in vitro* Interaktion des rekombinant hergestellten HK620TSP mit dem Lipopolysaccharid von *E. coli* H TD2158 untersucht. Dabei wurde auch die Struktur des O-Antigens von *E. coli* H charakterisiert.

3.4.1.1. Reaktion von HK620TSP mit Lipopolysaccharid von *E. coli* H.

Um zu prüfen, ob HK620TSP spezifisch mit dem Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* H reagiert, wurde das LPS mit heißer Phenolextraktion aus *E. coli* H TD2158 isoliert und mit Ethanol fällung gereinigt. Im silbergefärbten SDS-Gel zeigt das LPS von *E. coli* H TD2158 mittlere Kettenlängen von 13 O-Antigen *repeats* (Abbildung 31A). Beim Verdau mit HK620TSP werden im Reaktionsansatz reduzierende Enden erzeugt (Abbildung 31B) und die Konzentration an kurzen Ketten nimmt zu (Abbildung 31A). Dies bedeutet, dass HK620TSP spezifisch das O-Antigen der Wirtszelle *E. coli* H spaltet. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem Befund, dass der Phage HK620 nur mit Kolonien in S-Form (*smooth colonies*) reagiert (Dhillon *et al.*, 1998), d.h., die lange Ketten mit repetitiven O-Antigeneinheiten ausbilden. Eine Interaktion mit der *core*-Struktur des LPS, wie sie z.B. für die Phagen ϕ X174, T4 oder T7 beschrieben wurde, scheint damit ausgeschlossen (Lindberg, 1977).

3.4.1.2. Charakterisierung der O-Antigenstruktur und der O-Antigenschnittstelle von HK620TSP

Aus der immunologischen Typisierung des O-Antigens des *E. coli* H Stamms TD2158 erhielt man für den Serotyp O18 (A.J. Clark, pers. Mitteilung). Bei der Analyse wurde jedoch nicht zwischen den spezifischen Epitopen der vier serologischen Untergruppen O18A, O18A1, O18B und O18B1 unterschieden (Pluschke *et al.*, 1986). Die O-spezifischen Polysaccharideinheiten des O18-Antigens bestehen aus L-Rhamnose (Rha), N-acetyl-D-glucosamin (GlcNAc), D-Galaktose (Gal) und D-Glucose (Glc) in verschiedenen molaren Verhältnissen und Verknüpfungsmustern der Monosaccharide (Jann *et al.*, 1992).

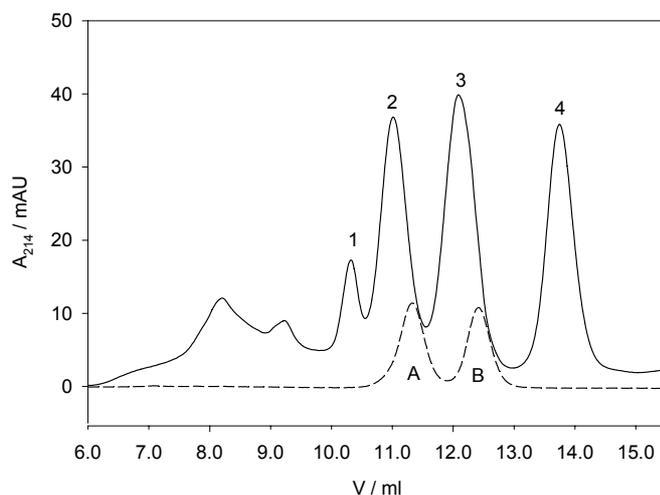


Abbildung 32.

Gelfiltration von 0.6 mg LPS nach Verdau mit 50 μ g/ml HK620TSP auf Superdex Peptide HR. Fraktionen, die die Peaks 1-4 enthalten, wurden mit MALDI-MS analysiert (siehe Tabelle). Zum Vergleich ist ein Gelfiltrationslauf eines Gemischs von je 10 μ g Dodecasaccharid (A) und Oktasaccharid (B) des O-Antigens von *Shigella flexneri* (siehe Abschnitt 1.4.2.) gezeigt.

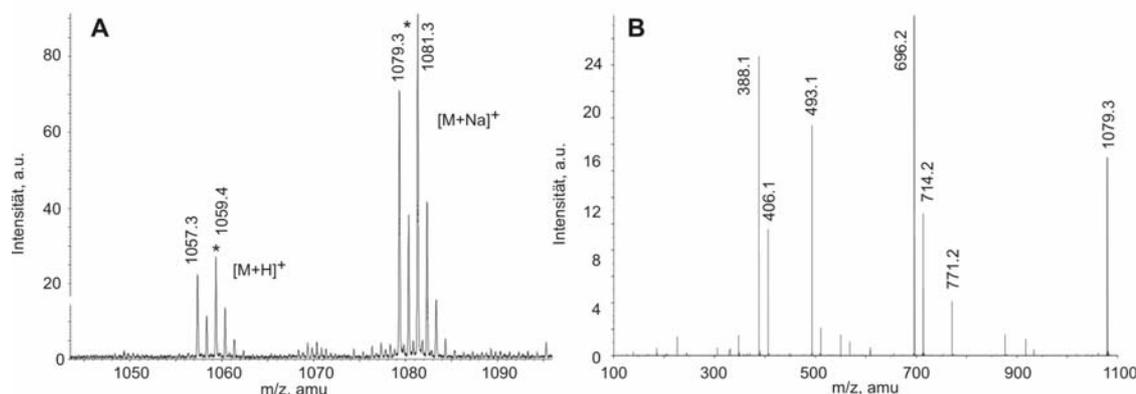


Abbildung 33.

ESI-MS-Analyse einer Oligosaccharidfraktion (Fraktion 4) nach Gelfiltration eines LPS-Verdau von *E. coli* H TD2158 mit HK620TSP (siehe auch Abbildung 32). Spray aus 5 % Ameisensäure. A. ESI-TOF-Spektrum der intakten Probe mit protonierten Molekülen und Molekülen als Natriumaddukten. Der Stern kennzeichnet am reduzierenden Ende deuterierte Moleküle. B. Kollisionsinduziertes ESI-MS-TOF-Fragmentspektrum des nicht deuterierten Mutterions $[M+Na]^+$ bei m/z 1079.3 amu. Das Fragmentspektrum des deuterierten Mutterions $[M+Na]^+$ bei m/z 1081.3 amu ist nicht gezeigt. Die Zuordnung aller gefundenen Fragmentationen zu Oligosaccharidfragmenten ist in Anhang B tabelliert.

Um zu klären, welche O-Antigenstruktur im Stamm *E. coli* H TD2158 vorliegt und um eine spezifische Schnittstelle für HK620TSP auf dem O-Antigen zu lokalisieren, wurde ein Verdau des LPS mit HK620TSP mittels Gelfiltration aufgetrennt und die Fraktionen massenspektrometrisch analysiert. In der Gelfiltration lassen sich vier Fraktionen des LPS-Verdau separieren. Dabei ist Fraktion 4 vermutlich die kleinste repetitive Einheit, die von HK620TSP erzeugt wird, wie ein Vergleich mit Dodekasacchariden und Oktasacchariden als Größenstandards zeigt. Im Folgenden wurde die Struktur des Fragments aus Fraktion 4 mit massenspektrometrischen und saccharidchemischen Methoden charakterisiert. Dazu wurde es mit $H^{18}O_2$ am reduzierenden Ende markiert und im ESI-MS-TOF fragmentiert und analysiert (Abbildung 33, Tabelle im Anhang B). Aus den Massendifferenzen der erhaltenen Fragmente zum Mutterion lassen sich die Anzahl der Monosaccharidbausteine und die Sequenz ableiten. Die Differenz von 2 Da zwischen deuterierten und nicht deuterierten Molekülen gibt Informationen darüber, welcher Zucker sich am reduzierenden Ende befindet. Beim untersuchten Oligosaccharid handelt es sich demnach um ein Hexasaccharid, das aus drei Hexosen, einer Desoxyhexose und zwei N-acetylhexosaminen besteht. Das N-acetylhexosamin befindet sich am reduzierenden Ende. Zusätzlich lässt sich im ESI-MS ein Fragmentation bei m/z 911.4 nachweisen, das bereits vor dem kollisionsinduzierten Fragmentierungsschritt auftritt. Dieses Fragment konnte im MALDI-Verfahren nicht nachgewiesen werden. Es wurde ebenfalls als Mutterion im ESI-MS-TOF ausgewählt und fragmentiert (Tabelle im Anhang B). Bei diesem Fragment ist die Desoxyhexose abgespalten. Vermutlich entsteht es durch saure Hydrolyse während des Elektrospray-Ionisierungsprozesses in 5 % Ameisensäure. Zur Charakterisierung der Monosaccharidbausteine des Hexasaccharids wurde außerdem mit der gleichen Probe eine saure Totalhydrolyse durchgeführt und das Hydrolysat auf einer Dionex Säule mit Standards vergli-

Tabelle 15. MALDI-TOF Analyse von Oligosaccharidfraktionen nach Verdau von *E. coli* H TD2158 LPS mit HK620TSP und Auftrennung auf Superdex Peptide HR (Abbildung 32).

Peak	Elutionsvolumen / ml	[M+Na] ⁺ _{exp.} ^a	[M+Na] ⁺ _{ber.} ^a	Oligosaccharid ^b
1	14.6	4156.4	4154.0	[Hex] ₄ [*]
2	15.6	3158.0	3156.5	[Hex] ₃
3	17.2	2077.2	2077.0	[Hex] ₂ [*]
4	19.8	1079.7	1079.5	[Hex] ₁

^am/z in kD, ^b[Hex] hat die Struktur **1**, * einfach deacetyliert.

Beim P22TSP und Sf6TSP handelt es sich im Gegensatz zu HK620TSP um Endorhamnosidasen. Bei P22TSP und Sf6TSP entstehen als kleinste Abbauprodukte ihrer O-Antigensubstrate Vielfache von Tetrasaccharid-*repeats* (Baxa *et al.*, 1996; Freiberg *et al.*, 2003). Ähnliche Kettenlängen der Hydrolyseprodukte bei allen drei Tailspike Proteinen könnten für HK620TSP auf eine ähnliche Struktur der Bindestelle und des aktiven Zentrums hindeuten. Die für langkettige Polysaccharidsubstrate benötigte elongierte Bindestelle könnte somit ebenfalls auf einer rechtsgängigen parallelen β -Helixdomäne lokalisiert sein. Beim P22TSP werden große Wechselwirkungsbereiche des Oligosaccharids mit dem Protein als wichtig für eine breitere Spezifität gegenüber Seitenkettenvariationen des O-Antigens erachtet, allerdings ist nur eine der beiden das aktive Zentrum flankierenden Bindestellen hochaffin (Baxa, 1998). Dies wurde als Erklärung dafür angesehen, dass beim P22TSP beim Verdau seines Substrates hauptsächlich Okta- und Dodekasaccharide, jedoch kaum Tetrasaccharide entstehen. Die gleiche Beobachtung wurde bei anderen O-Antigen-spezifischen Phagen wie z.B. $\Omega 8$ gemacht (Reske *et al.*, 1973). Bei HK620TSP werden jedoch während des LPS-Verdaus signifikante Mengen Hexasaccharid gebildet, was auf eine andere Anordnung der Bindestellen auf dem Protein hindeuten könnte. Für zukünftige Untersuchungen müssten deshalb zunächst Oligosaccharidfragmente in größeren Mengen isoliert werden. Mit diesen könnten in Analogie zum P22TSP und Sf6TSP Bindungs- und Aktivitätsstudien an HK620TSP durchgeführt werden.

4. Untersuchungen am Tailspike Protein des Bakteriophagen Sf6

4.1. Röntgenkristallstrukturanalyse von Sf6TSP Δ N

In dieser Arbeit wurde die Röntgenkristallstruktur des C-terminalen Fragments Sf6TSP Δ N (Asp¹⁰⁹-Ile⁶²³) aufgeklärt. In der vorangegangenen Arbeit von Alexander Freiberg ist das Protein biochemisch und spektroskopisch untersucht worden und mit dem Tailspike Protein des Bakteriophagen P22 verglichen worden (Freiberg, 2000; Freiberg *et al.*, 2003). P22TSP (666 Aminosäuren) und Sf6TSP (623 Aminosäuren) haben 74 % Sequenzidentität in den ersten 110 Aminosäuren. Diese Domäne ist für die Bindung des Kapsids verantwortlich (Maurides *et al.*, 1990). Im größeren, C-terminalen Teil sind jedoch keine Sequenzübereinstimmungen mehr feststellbar (Casjens *et al.*, 2004; Chua *et al.*, 1999). Für P22TSP wurde das C-terminale Fragment P22TSP Δ N (Asp¹⁰⁹-Leu⁶⁶⁶) kristallisiert. Es hat die Struktur einer trimeren, rechtsgängigen parallelen β -Helix (Steinbacher *et al.*, 1994). Auch bei Sf6TSP handelt es sich um ein trimeres, thermostabiles und proteasereistentes Protein mit hohem β -Sekundärstrukturanteil (Freiberg *et al.*, 2003). Die Röntgenstrukturanalyse einer Selenomethioninmutante von Sf6TSP Δ N konnte in dieser Arbeit die Hypothese bestätigen, dass Sf6TSP wie P22TSP trotz fehlender Sequenzübereinstimmungen eine rechtsgängige, parallele β -Helix ausbildet. Das Strukturmodell von Sf6TSP Δ N wird im Folgenden beschrieben und mit dem von P22TSP Δ N verglichen.

4.1.1. Kristallisation und Datenaufnahme

4.1.1.1. Kristallisation von Sf6TSP Δ N und Sf6TSP Δ NMet(Se)

In der vorangegangenen Arbeit hat Alexander Freiberg die Kristallisationsbedingungen für Sf6TSP und Sf6TSP Δ N untersucht. Während das Vollängenprotein nicht kristallisiert werden konnte, erhielt man aus 6 % PEG 20 000, 0.1 M MES, pH 6.2 Kristalle der ver-

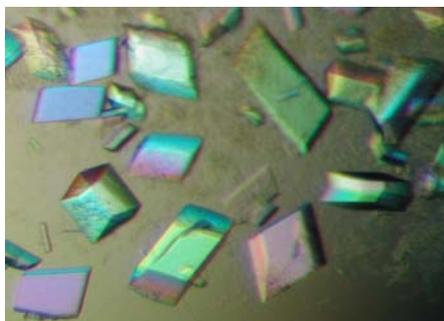


Abbildung 34.

Kristallisation von Sf6TSP Δ NMet(Se) nach 7 Tagen in 0.1 M MES, pH 6, 20 mM MnCl₂, 18% PEG 8000, Raumgruppe R3. Kantenlänge ca. 200 μ m.

kürzten Variante Sf6TSP Δ N. Sie haben die Raumgruppe R3 (primitiv orthorhombisch) (Freiberg, 2000). Diese Kristalle treten jedoch verzwilligt auf und sind für die Messungen unter Kryobedingungen ungeeignet. Die Kristallisationsbedingung wurde deshalb zunächst optimiert auf 18% PEG 8000, 0.1 M MES, pH 6. Auch hier treten Zwillinge auf. Einkristalle wurden optisch und anhand ihres Beugungsmusters selektiert. Für einen dieser Kristalle wurde mit Synchrotronstrahlung ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 1.25 Å erhalten (Messung durchgeführt von Dr. Jürgen Müller, Daten

nicht gezeigt). Eine Bestimmung der Phase mit der Methode des molekularen Ersatzes (Glusker *et al.*, 1994) mit P22TSP Δ N als Modell war jedoch aufgrund der nicht vorhandenen Sequenzidentität mit Sf6TSP Δ N unmöglich. Auch die Reduktion der Aminosäuresequenz auf Polyalanin und die Verwendung eines auf die Minimal- β -Helix ohne *loops* zurück geschnittenen Modells von P22TSP Δ N ergab keine Phaseninformation für Sf6TSP Δ N (J.Müller, persönliche Mitteilung). Daraufhin wurde nach Standardprotokollen die Selenomethioninmutante von Sf6TSP Δ NMet(Se) hergestellt (Budisa *et al.*, 1995) und unter den gleichen Bedingungen wie das native Protein kristallisiert. Man erhält Kristalle der gleichen Raumgruppe und Dimensionen der Einheitszelle. Zugabe von 20 mM Manganchlorid zum Kristallisationspuffer verringerte das Auftreten von Zwillingskristallen (Abbildung 34). Mittels optischer Auswahl und Indizierung der Beugungsmuster wurden ca. 100 Kristalle getestet, dabei fand man etwa 10 % Einkristalle.

4.1.1.2. Datenaufnahme und -prozessierung

Die Datenaufnahme an einem Einkristall von Sf6TSP Δ NMet(Se) erfolgte durch Dr. Jürgen Müller mit Synchrotronstrahlung am ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France) (siehe Material und Methoden). Bei der Messwellenlänge von 0.9795 Å wird im Maximum der Absorption der Selenatome gemessen und ein anomales Signal registriert. Es wurde ein Datensatz bis 1.98 Å Auflösung gemessen (Tabelle 16). Er konnte mit der SAD-Methode (*single anomalous dispersion*) phasiert werden. Dimension und Symmetrie der Elementarzelle deuten bereits auf eine Ausrichtung der Moleküle entlang der längsten dreizähligen c-Achse (182.6 Å) hin.

Tabelle 16. Datensatz für Sf6TSP Δ NMet(Se)

Raumgruppe	R3
Auflösung / Å	20 - 1.98
Gefundene / einmalige Reflexe	197,003 / 87,351
Vollständigkeit / % (gesamt / äußere Schale)	98.3/87.5
$\langle I / \sigma(I) \rangle$ (gesamt / äußere Schale)	11.1 / 8.0
R_{sym} / % (gesamt / äußere Schale)	5.2 / 8.2
Mittlere Redundanz	2.3
B / Å ² , Wilson Statistik / Mittelwert	21.0 / 12.4
Mosaizität / °	0.17
Dimensionen der Einheitszelle a / Å, c / Å	95.91 / 182.60
Matthewskoeffizient / Da Å ³	2.9

4.1.2. Modellierung, Verfeinerung und Validierung des Strukturmodells

Aus dem 1.98 Å Datensatz für Sf6TSPΔNMet(Se) wurde von Dr. Jürgen Müller die Phase mit der SAD Methode berechnet. Daraus konnte ein Startmodell zur Strukturverfeinerung gebaut werden (siehe Material und Methoden), mit dem die weiteren Schritte zu Modellbau und Verfeinerung in dieser Arbeit erfolgten. Dazu wurde das Strukturmodell mit dem graphischen Modellierprogramm O (Jones *et al.*, 1991) manuell in die Elektronendichte eingepasst. Anschließend wurden die Strukturfaktoren mit dem Programm REFMAC5 (Bailey, 1994) verfeinert. Diese Schritte wurden wiederholt und so das Modell iterativ verfeinert. Die kristallographischen R-Werte dienen dabei als Qualitätskontrolle. Sie berechnen sich aus der Summe über alle Reflexe aus den Strukturfaktoren zu $R_{\text{krist}} = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$. F_o ist dabei die gemessene Amplitude der Strukturfaktoren, F_c die mit dem Modell berechnete. Als Kriterium für die Verbesserung des Strukturmodells während der Verfeinerung wird außerdem der R_{free} -Wert verwendet. Er wird aus einem Referenzdatensatz von 5-10 % aller Reflexe auf die gleiche Weise wie der kristallographische R-Wert berechnet. Die Reflexe des Referenzdatensatzes werden jedoch nicht mit verfeinert sondern dienen zur Kontrolle des Arbeitsdatensatzes (Brunger, 1992). Das

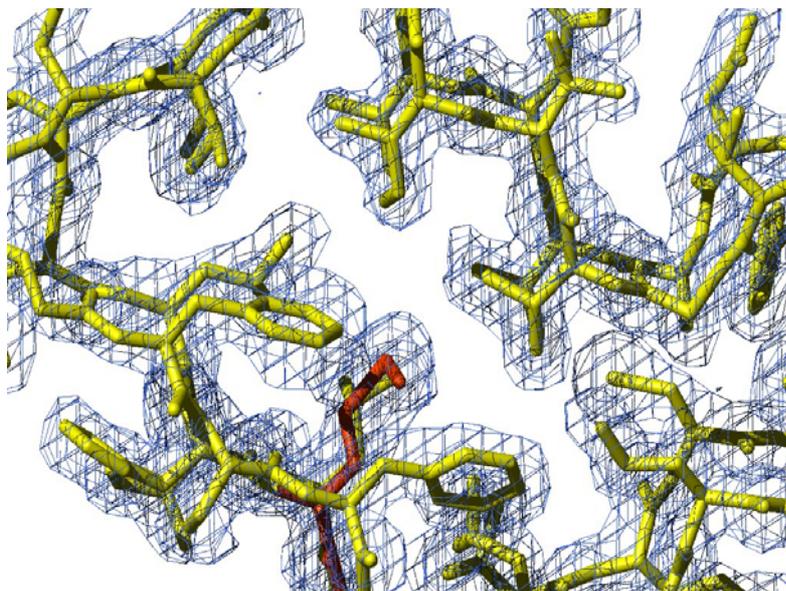


Abbildung 35.

$2F_o - F_c$ Karte, berechnet aus den anomalen Signalen von 6 Selenatomen in Sf6TSPΔNMet(Se), konturiert bei 1σ (blaues Gitternetz). Es ist ein Ausschnitt von zwei sukzessiven Windungen (Reste 369-419) der parallelen β -Helix-Domäne gezeigt. In Gelb ist das verfeinerte Strukturmodell eingezeichnet. Ein zur Phasierung verwendetes Selenomethionin (SeMet³⁷⁵) ist in rot dargestellt.

finale Modell von Sf6TSPΔNMet(Se) hat einen kristallographischen R-Wert von 11.9 %, R_{free} beträgt 14.9 %. Diese hohe Genauigkeit des Modells entsteht durch die hohe Qualität der experimentellen Dichte. Entsprechend passt sich das Strukturmodell bereits in die ohne Verfeinerung direkt aus den experimentellen Phasen erhaltene Elektronendichte gut ein (Abbildung 35).

Die Güte der experimentell bestimmten

Phasen wird durch die Eigenschaften des Kristalls selbst beeinflusst: Der Kristall hat eine niedrige Fehlordnung (Mosaizität), niedrigen Lösungsmittelgehalt und eine hohe Packungsdichte. Damit kann eine hohe Strukturauflösung erreicht werden. Der vorliegende Datensatz wurde dabei nicht bis zur maximalen Auflösung des Kristalls gemessen, wes-

halb man eine sehr niedrige Abweichung der Intensitäten zwischen mehrfach gemessenen Reflexen beobachtete (R_{sym} , Tabelle 16). Niedrige Temperaturfaktoren zeigen zudem, dass die Elektronendichte der einzelnen Atome gut lokalisierbar ist, weil große Teile des Moleküls in die rigide Struktur der parallelen rechtsgängigen β -Helix eingebunden sind. Eine Auftragung der B-Werte gegen die Sequenz zeigt Abbildung 36. Insgesamt konnten 510 von 514 Resten (Aminosäuren 113-622) von Sf6TSP Δ NMet(Se) in die Elektronendichte modelliert werden. Lediglich die vier N-terminalen Reste sind in der Dichte nicht sichtbar. Die asymmetrische Einheit enthält ein Proteinmolekül. Die Monomere sind so zur längsten dreizähligen Achse orientiert, dass sie ein kristallographisches Trimer ausbilden. Das Modell enthält außerdem 629 Wassermoleküle, 2 Calciumionen und ein Manganion. Die finalen Koordinaten wurden für die Übermittlung an die Datenbank vorbereitet (RCSB Protein Data Bank, <http://www.pdb.org/>)(Berman *et al.*, 2000). Mit Sf6TSP Δ NMet(Se) als Modell konnte im Anschluss der native Datensatz mit 1.25 Å Auflösung phasiert werden und eine hochaufgelöste Struktur erhalten werden (J.Müller, pers. Mitteilung). In dieser Arbeit wird das Strukturmodell basierend auf dem 1.98 Å Datensatz besprochen. Es zeigt keine wesentlichen Unterschiede zu der hochaufgelösten Struktur.

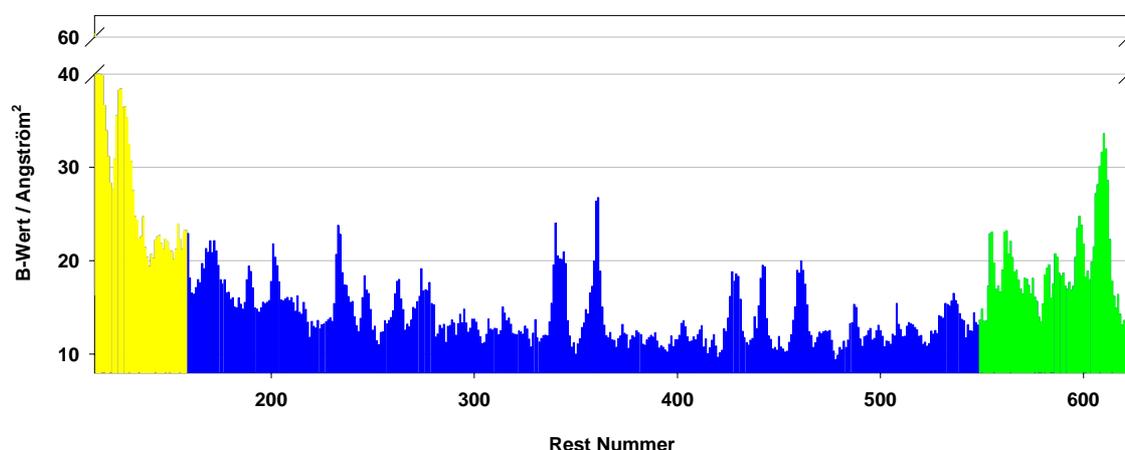


Abbildung 36.

Abhängigkeit der Temperaturfaktoren der $C\alpha$ -Atome von der Lage in der Sequenz. Oben: B-Werte in Å² des N-terminalen Abschnitts (gelb), der β -Helix-Domäne (blau) und der C-terminalen Domäne. Rechts: $C\alpha$ -Atome eines Monomers von Sf6TSP Δ N koloriert mit einem Farbverlauf von niedrigen (blau) zu hohen B-Werten (rot).

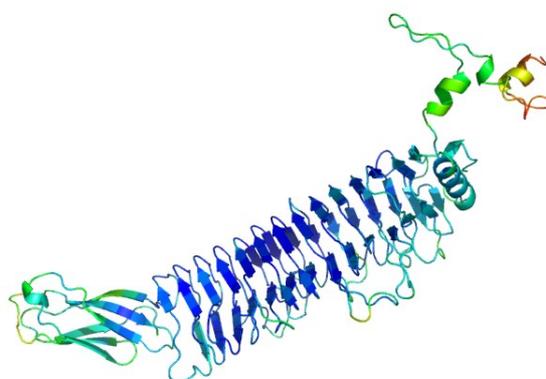


Tabelle 17. Verfeinerungsstatistik für Sf6TSP Δ NMet(Se)

$R / R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	11.9 / 11.7 / 14.9
Korrelationskoeffizient $(F_o - F_c)_{\text{work}} / (F_o - F_c)_{\text{free}}$	0.970 / 0.956
Koordinatenfehler über alles (aus $R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$) (Å)	0.110 / 0.103
rms Δ Bindungslängen (Å)	0.015
rms Δ Bindungswinkel (°)	1.448
rms Δ Torsionswinkel (°)	6.903
B , main-chain bond atoms (Å ²), rms-iso	0.74
B , main-chain angle atoms (Å ²), rms-iso	1.33
B , side-chain bond atoms (Å ²), rms-iso	2.36
B , side-chain angle atoms (Å ²), rms-iso	3.75
Position im Ramachandran Plot core / allowed / general / forbidden (%)	86.1 / 13.2 / 0.2 / 0.5
Monomere pro Elementarzelle	1
Protein: Aminosäuren / Atome	113-622 / 3865
Anzahl der Atome (ohne Wasserstoff)	4562
Wassermoleküle / Phosphationen	629 / 2
Ethylenglycol	6
Ca ²⁺ / Mn ²⁺	2 / 1
Alternative Konformationen	17

4.2. Beschreibung und Diskussion des Strukturmodells von Sf6TSP Δ N

Sf6TSP ist das zweite Tailspike Protein eines Bakteriophagen aus der Morphologiekategorie der *Podoviridae*, für dessen Fragment Sf6TSP Δ N die Röntgenkristallstruktur aufgeklärt wurde. Es bildet eine trimere, parallele rechtsgängige β -Helixdomäne aus. Sf6TSP und P22TSP sind die einzigen Vertreter dieser Klasse, alle anderen bisher gefundenen rechtsgängigen parallelen β -Helices sind Monomere (Jenkins & Pickersgill, 2001). Im folgenden wird die Struktur von Sf6TSP Δ N basierend auf dem mit einer Selenomethioninmutante erhaltenen Modell beschrieben und diskutiert. Zur Vereinfachung wird an Positionen von Selenomethionin in der Beschreibung Methionin verwendet. Die Struktur wird mit der von P22TSP Δ N verglichen (Abbildung 37).

Sf6TSP Δ N bildet ein kompaktes Trimer mit einer Länge von 135 Å und einem größten Durchmesser von 75 Å aus. Die kristallographische c-Achse mit dreizähliger Symmetrie bildet dabei die Trimerachse der biologisch aktiven Einheit. Die Sekundärstrukturanalyse erfolgte mit dem Programm PROMOTIF und HERA (Hutchinson & Thornton, 1990; Hutchinson & Thornton, 1996).

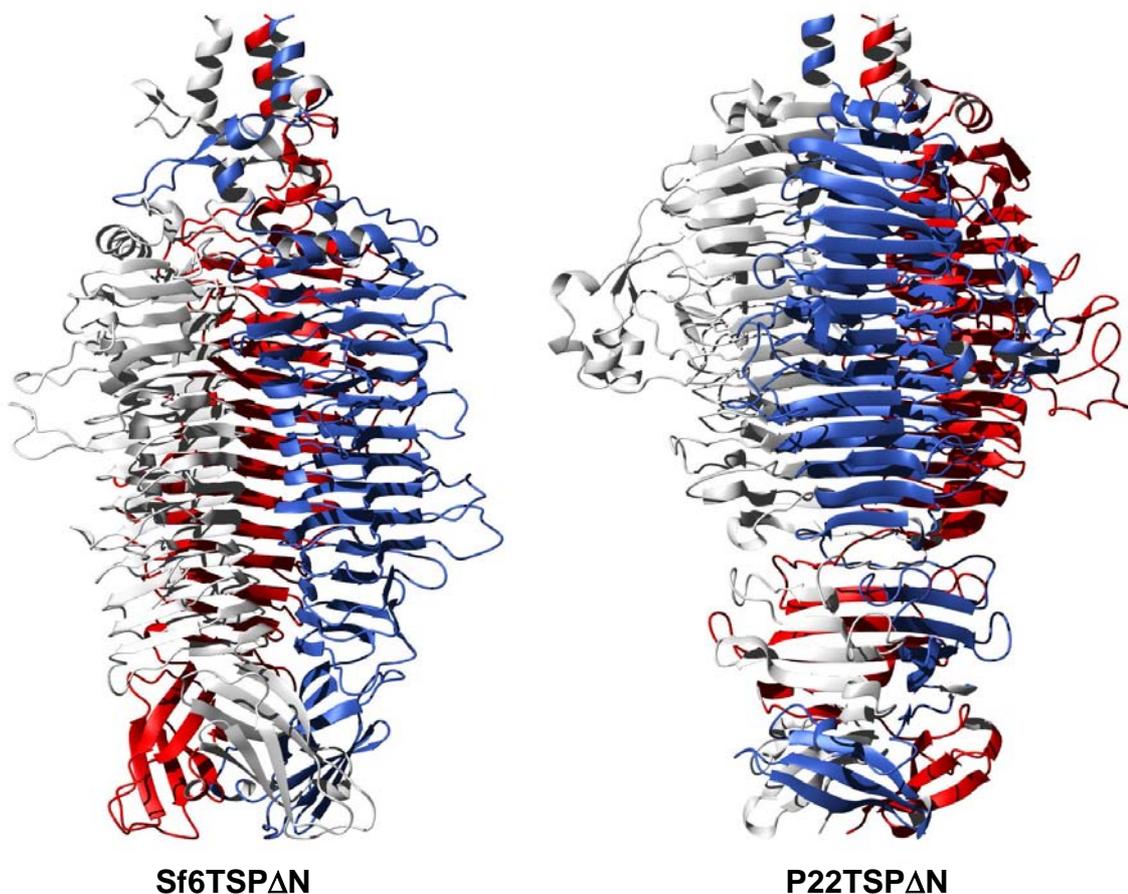


Abbildung 37.

Trimere von Sf6TSP Δ N und P22TSP Δ N. Alle Bilder wurden mit dem Programm MOLMOL erstellt (Koradi *et al.*, 1996). Beide Moleküle haben die gleiche Länge von 135 Å. Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm PROMOTIF (Hutchinson & Thornton, 1996) ermittelt.

4.2.1. Struktur des Monomers

Ein Monomer von Sf6TSP Δ N besteht aus drei Domänen, 389 der 516 Aminosäuren falten zu einer rechtsgängigen parallelen β -Helix mit 13 vollständigen Windungen (Ile¹⁶⁰-Val⁵⁴⁸) (s.u.) (Abbildung 38). Die β -Helix wird N-terminal flankiert von 46 Aminosäuren (Phe¹¹³-Glu¹⁵⁸) mit Helix-loop-Helix-Struktur. Am C-Terminus befindet sich ein 6-strängiges β -sandwich (Ser⁵⁵⁰-Ile⁶²²). Die N-terminalen Aminosäuren Asp¹⁰⁹-Gln¹¹² zeigten keine Elektronendichte, für Phe¹¹³ wurde keine Dichte für die Seitenkette gefunden.

4.2.1.1. N-terminaler Abschnitt (Phe¹¹³-Glu¹⁵⁸)

Im Volllängenprotein Sf6TSP stellen die ersten 108 Reste, die in allen drei Tailspike Proteinen hohe Sequenzidentität aufweisen, die das Kapsid bindende N-terminale Domäne dar. Für den N-terminalen Abschnitt des Fragments Sf6TSP Δ N (Reste 109-622) soll daher der Begriff „N-terminale Domäne“ vermieden werden.

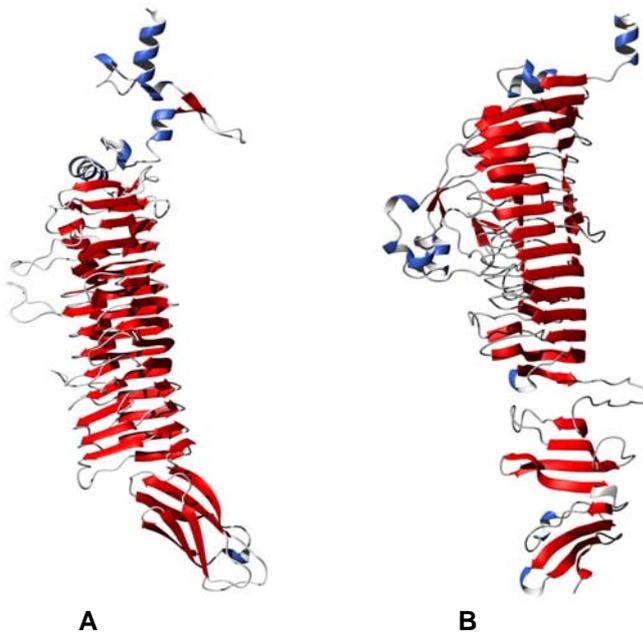


Abbildung 38.

Monomere von Sf6TSP Δ N (A) und P22TSP Δ N (B).

Der Vollständigkeit halber wird außerdem bereits in diesem Teil die Organisation der N-terminalen Abschnitte im Trimer von Sf6TSP Δ N diskutiert.

Die 46 Aminosäuren am N-terminalen Ende von Sf6TSP Δ N bestehen aus zwei α -Helices, die parallel und im Abstand von ca. 5.5 Å zur langen Molekülachse liegen (Abbildung 41). Nach der ersten α -Helix mit drei Windungen

(Phe¹¹³-Ala¹²²) knickt die Peptidkette ab und bildet einen *hairpin loop* im Winkel von 120° zur Molekülachse aus. Er wird durch ein kurzes, zweisträngiges β -Faltblatt aus Gly¹³⁹-Val¹⁴⁰ und Arg¹⁵¹-Thr¹⁵² stabilisiert. Die folgende zweite α -Helix (His¹⁵³-Glu¹⁵⁸) verläuft parallel zur ersten, ist aber gegenüber dieser um 60° im Uhrzeigersinn um die Molekülachse verschoben. Am Beginn und Ende des *hairpin loops* befindet sich in Sf6TSP Δ NMet(Se) Elektronendichte für ein Mn²⁺-Ion (Abbildung 39). Es ist über einen Carbonylsauerstoff von Asp¹³⁵ sowie das ϵ -Stickstoffatom von His¹⁵³ koordiniert. Die oktaedrische Koordinationssphäre wird durch 4 Wassermoleküle vervollständigt. Das Mn²⁺-Ion stammt aus dem Kristallisationspuffer (siehe unten).

Im Vergleich zu P22TSP Δ N, in dem vor dem Beginn der β -Helixdomäne nur 7 Aminosäuren zu einer einzigen α -Helix im Abstand von ca. 3.5 Å zur Trimerachse gefaltet

sind, organisiert Sf6TSP Δ N 46 Aminosäuren zwischen N-terminaler Domäne und β -Helixdomäne in zwei α -Helices im Abstand von 5.5 Å zur Trimerachse, die durch den *hairpin loop* unterbrochen sind. Bei beiden Proteinen ist erst ab Rest 112 Elektronendichte vorhanden, der Abstand zur β -Helixdomäne, gemessen zum Ende der zweiten Helix beträgt in Sf6TSP Δ N jedoch ca. 35 Å, in P22TSP Δ N nur ca. 15 Å. Unter der hypothetischen Annahme, dass sich aufgrund der hohen Sequenzidentität die Stabilitäten der N-terminalen Domänen der Voll-

längenproteine von P22TSP und Sf6TSP nicht wesentlich unterscheiden, lässt dieser ca. 20 Å geringere Abstand die Vermutung zu, dass in P22TSP eine stabilisierende Wechselwirkung zwischen N-terminaler Domäne und dem restlichen Protein eher möglich ist als in Sf6TSP. Darauf deuten verschiedene Befunde hin:

- P22TSP ist in Gegenwart der N-terminalen Domäne stabiler gegen Chaotrope.
- Die N-terminale Domäne von P22TSP ist bei Raumtemperatur proteasestabil.
- In Gegenwart von SDS entfaltet die N-terminale Domäne von P22TSP erst beim Erhitzen, sichtbar ist dies im Experiment der thermischen Denaturierung als das Auftreten eines Entfaltungsintermediats.

Diese Punkte treffen für Sf6TSP nicht zu. Seine N-terminale Domäne stabilisiert das Protein nicht gegen Chaotrope. Außerdem ist sie bei RT weder protease- noch SDS-resistent. Die SDS-Resistenz von Sf6TSP bei Raumtemperatur ist jedoch von der Konzentration an zweiwertigen Ionen abhängig (Freiberg, 2000). In der SDS-PAGE von Sf6TSP wird häufig eine Doppelbande beobachtet. Sie deutet auf das Vorhandensein verschiedener Spezies SDS-resistenter Trimere hin. Durch Zugabe von NaEDTA oder z.B. Manganchlorid kann das Gleichgewicht zwischen den Banden vollständig in beide Richtungen verschoben werden (Abbildung 40). Im Fragment Sf6TSP Δ NMet(Se) wurde eine Bindestelle für Mangan im N-terminalen Abschnitt lokalisiert. Da sonst keine frei zugänglichen Bindestellen für zweiwertige Ionen gefunden wurden, lässt dies die Vermutung zu, dass die Bindung von zweiwertigen Ionen am Ursprung des N-terminalen *loops* die Funktion einer stabilisierenden Klammer haben könnte, zumindest in Gegenwart von SDS. Der *loop* wird an-

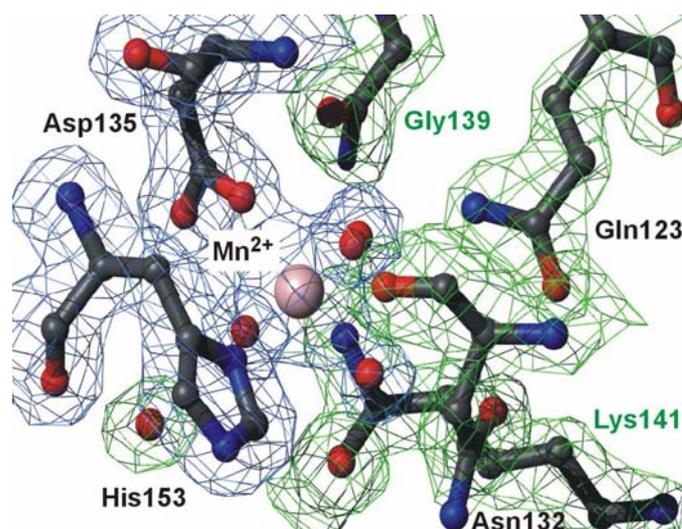


Abbildung 39. Manganbindung in Sf6TSP Δ NMet(Se). $2F_o - F_c$ -Karte, konturiert bei 1σ am oktaedrisch koordinierten Mn^{2+} -Ion (rosa). Sauerstoffatome sind rot, Kohlenstoffatome schwarz und Stickstoffatome blau dargestellt. Die grün konturierte Elektronendichte gehört zur zweiten Koordinationssphäre, grün markierte Reste gehören zur Nachbaruntereinheit.

sonsten nur durch ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt aus je zwei Resten stabilisiert. Das Mn^{2+} -Ion oder ein anderes zweiwertiges Ion wurde nicht in der 1.25 Å Struktur eines nativen Kristalls von Sf6TSP Δ N gefunden (J.Müller, persönliche Mitteilung). Hier waren im Kristallisationspuffer keine zweiwertigen Ionen vorhanden (siehe Abschnitt 4.1.1.). Weiterführende Experimente müssen klären, inwieweit die elektrostatische Wechselwirkung mit zweiwertigen Ionen wie z.B. Manganchlorid den N-terminalen Abschnitt und die N-terminale Domäne von Sf6TSP gegen Proteolyse und thermische Denaturierung stabilisieren kann. In P22TSP ist das Protein bis Lys¹²⁰ proteasezugänglich. Das entstehende Frag-

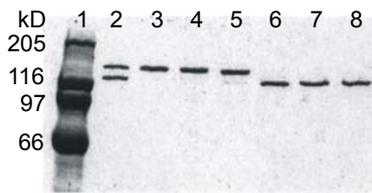


Abbildung 40.

SDS-PAGE von Sf6TSP (Volllänge) in Abhängigkeit von der Konzentration an zweiwertigen Ionen 0.5 μ g Protein / Spur in 10 mM Na-MOPS, pH 7. 1: Marker. 2: ohne Zusatz. 3: 5 mM NaEDTA. 4: 10 mM NaEDTA. 5: 20 mM NaEDTA. 6: 1 mM $MnCl_2$, 7: 2 mM $MnCl_2$, 8: 5 mM $MnCl_2$.

ment P22TSP Δ N wurde für die Kristallisation kloniert (Chen & King, 1991; Danner *et al.*, 1993). Bei Sf6TSP wurde nur anhand von Sequenzalignments ein verkürztes, C-terminales Fragment kloniert. Vorläufige Experimente mit limitierender Proteolyse scheinen eine weitere Proteasezugänglichkeit des Proteins am N-Terminus zu bestätigen (Daten nicht gezeigt).

Die Stabilisierung der N-terminalen Domäne gegen SDS-Denaturierung bei RT über elektrostatische Wechselwirkungen wird auch in P22TSP beobachtet. Die Punktmutation D100N führt zu einer trimeren Spezies, die im SDS-Gel ohne Erhitzen schneller migriert als das native Protein (Schwarz & Berget, 1989). Vermutlich liegt

der N-Terminus hier wie in Sf6TSP entfaltet vor. P22TSP D100N kann jedoch mit 1 % der Wildtypaktivität an Phagenköpfe binden. Im Wildtyp stabilisiert dagegen eine intermolekulare Salzbrücke von Asp¹⁰⁰ zu Arg¹³ der benachbarten Untereinheit den N-Terminus gegen SDS-Denaturierung bei RT (Steinbacher *et al.*, 1997). In Sf6TSP befindet sich anstelle von Arg¹³ ein Serinrest, so dass eine vergleichbare Salzbrücke wie im N-Terminus von P22TSP nicht möglich ist. Auch HK620TSP, dessen N-Terminus bei RT SDS-stabil ist, hat ein Serin an Position 13. Wie die einzelnen N-terminalen Domänen stabilisiert werden, kann somit vermutlich nur durch detaillierte Strukturanalyse geklärt werden.

Im Trimer von Sf6TSP Δ N bilden die zwei α -Helices des N-terminalen Abschnitts zwei Drei-Helix-Bündel aus. Das obere wird durch einen hydrophoben *cluster* stabilisiert (Phe¹¹³, Leu¹¹⁷, Ile¹¹⁸, Leu¹²¹, Met¹³⁷, and Ile¹³⁸). Im unteren fehlen hydrophobe Reste, stattdessen bilden Gln¹⁵² und Asn¹⁵⁶ eine intermolekulare Wasserstoffbrücke. Die *hairpin loops* zwischen den Helices verschränken sich mit den jeweils anderen beiden Ketten. Dadurch bedecken sie teilweise die *capping* Helix und Teile der ersten Windung der darunter liegenden β -Helixdomäne der jeweiligen Nachbaruntereinheit. Deren hydrophobe Reste (Leu¹⁶³, Phe¹⁶⁵, Gly¹⁶⁶, Val¹⁶⁷, Ile¹⁶⁸, Leu¹⁶⁹, and Pro¹⁷⁰) werden durch die *hairpin loops* jedoch nicht vom Lösungsmittel abgeschirmt, so dass eine hydrophobe Stabilisierung des Trimers hier unwahrscheinlich ist. Die *loops* bilden lediglich von Arg¹⁵⁰ nach Asp¹⁶⁴ eine

Wasserstoffbrücke aus. Um zu klären, ob der N-terminale *loop* für die Stabilisierung des nativen Trimers von Sf6TSP notwendig ist, wurde daher ein Konstrukt Sf6TSP Δ *loop* kloniert (Asp¹⁵⁴-Ile⁶²²). In weiterführenden Untersuchungen soll geklärt werden, ob es native Trimere ausbilden kann.

4.2.1.2. β -Helix-Domäne (Ile¹⁶⁰-Val⁵⁴⁸)

Die parallele rechtsgängige β -Helix von Sf6TSP Δ N hat 13 vollständige Windungen. Oberhalb der ersten Windungen findet man eine 3_{10} -Helix (Ile¹⁶²-Phe¹⁶⁵), einen γ -turn (Ile¹⁶⁸-Asp¹⁷⁰) sowie einen β -turn (Asp¹⁷⁰-Thr¹⁷³). Es folgt eine α -Helix aus 12 Resten (Tyr¹⁷⁶-Ala¹⁸⁷) als β -Helix-*capping* Motiv. Die Funktion des *capping* Segments besteht in der Abschirmung der hydrophoben Reste am Beginn der β -Helix (Jenkins & Pickersgill, 2001). Für Sf6TSP wurde in diesem Sequenzabschnitt ein „Glycanase-Motiv“ definiert. Es umfasst die Reste 165 bis 185 und hat die Konsensussequenz DFGX₃DGX₆AX₃A (Asp¹⁶⁴-Ala¹⁸²). Das „Glycanase-Motiv“ ist als putative Polysaccharidbindestelle von Sf6TSP postuliert worden, da man es auch in anderen Polysaccharid abbauenden oder modifizierenden Enzymen identifiziert hat (Chua *et al.*, 1999). In vielen bekannten Strukturen dieser Enzyme wurde diese Konsensussequenz jedoch im *capping* Segment einer β -Helix und nicht an einer Kohlehydratbindestelle gefunden, z.B. in der Iota-Carragenase aus *Alteromonas fortis* (Barbeyron *et al.*, 2000; Michel *et al.*, 2001). Dies ist in Übereinstimmung mit dem Befund, dass bei der Strukturvorhersage mit dem Programm BETAWRAP gerade für diese Art von Enzymen β -Helices vorhergesagt werden (Bradley *et al.*, 2001). Das „Glycanase-Motiv“ ist jedoch kein eindeutiger Primärstrukturmarker für das β -Helix-Faltungsmotiv. Zum einen findet man parallele β -Helices auch ohne das *capping* Segment. Zum anderen sind *capping* Segmente auch ohne die postulierte Konsensussequenz vorhanden, ein Beispiel ist die kurze *capping* α -Helix (Leu¹³³-Ala¹³⁹) in P22TSP. Die erste voll-

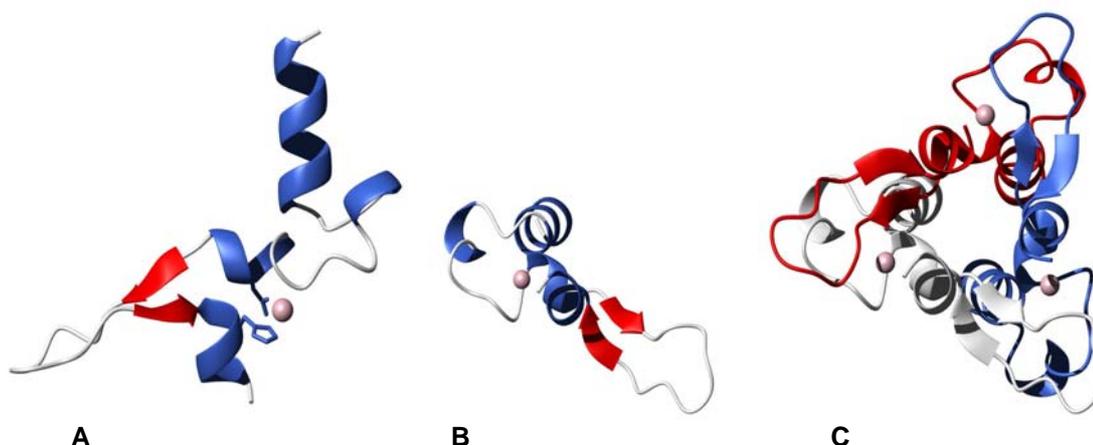


Abbildung 41.

N-terminaler Abschnitt von Sf6TSP Δ N (Phe¹¹³-Glu¹⁵⁸) mit Manganbindestelle. A. Blick senkrecht zur dreizähligen Achse. Am Ursprung des *hairpin loops* ist in der Selenomethioninmutante über Asp¹³⁵ und His¹⁵³ ein Mn²⁺-Ion (rosa) koordiniert (siehe Abbildung 20). B. Blick vom C-Terminus aus entlang der dreizähligen Achse. C. Anordnung im Trimer um die dreizählige Achse, Blick von unten.

ständige Windung der β -Helix beginnt mit Leu²¹³. Dabei wird die Organisation der Aminosäuren einer Windung nach der ursprünglich für Pektatlyase verwendeten Nomenklatur beschrieben (Heffron *et al.*, 1998; Jenkins & Pickersgill, 2001): Drei β -Stränge B1, B2, B3 sind durch die *turns* T1, T2, T3 verbunden. Die Länge von T2 ist auf 2 Aminosäuren limitiert. Dagegen sind die Längen von T1 und T3 flexibel. In Sf6TSPAN gibt es Ausnahmen von dieser Regel. Zum einen in Windung eins und zwei, in denen T2 9 bzw. 6 Aminosäuren hat, zum anderen in Windung sieben, wo man nur Gln³⁹⁵ in *turn* Konformation findet. In Sf6TSPAN erstreckt sich das Netzwerk der Wasserstoffbrücken der parallelen Faltblätter B2 und B3 dabei auch über die Reste in T2. Teilweise sind die *turns* aber auch gar nicht vorhanden und die β -Stränge gehen direkt ineinander über. In Windung sieben und acht ist kein T2 vorhanden und es wird nur ein einziger β -Strang aus B2 und B3 gebildet. In Windung drei und vier fehlen Reste in *turn* Konformation, die T3 entsprechen würden, und B3 geht direkt in B1 der folgenden Windung über.

Zusammen bilden alle Windungen drei große β -Faltblätter aus. Hydrophobe Reste weisen ins Innere der Helix, so dass die einzelnen Windungen einen L-förmigen Querschnitt haben. Ihre Länge variiert dabei zwischen 18 und 34 Aminosäuren. Der Abstand zwischen den $C\alpha$ -Atomen übereinander liegender Windungen beträgt ca. 4.7 Å. Im hydrophoben Inneren der β -Helix befinden sich keine Wassermoleküle. Man findet in der β -Helix von Sf6TSP mehrere nach innen weisende Stapel: Zwei Cysteinstapel (Cys⁴⁸², Cys⁵⁰⁵, Cys⁵²⁴, Cys⁵⁴⁵ und Cys³¹¹, Cys³³⁴), drei Valinstapel (Val⁴⁷⁷, Val⁵⁰⁰, Val⁵¹⁹; Val²⁵⁸,

Coil			
0	G	ELFIPASNQAVGYIVGST
1	LLIPGG.....	VNIR	GVGKAS...QLRAKSGLTGSV
2	LRLFYDSDTIG.....	RYLRNI.....	RTGNNTCNG
3	IDTNITAEDSVIRQVY.....	GWV	DNV.....MINEVETA
4	YLMQGLW.....	HSK	IAC.....QAGTCRVG
5	LHFLGQCVS.....	VSVSSC.....	HFSRGNYSADSFSG
6	IRIQPQTYAWSSEAVRSEA.....	IILDSE.....	TMCI GFKNA
7	WYHDCL.....	DLHMEQ.....	LDLDYCGSTG
8	VVIENVNGG.....	FSFSN.....	SWAADADGTEQFTG
9	YFRTPTSTQSH.....	KIISG.....	VHNTANKNTAANNQS
10	AAEQSAI.....	FIFVSGC.....	TLTGDEWA
11	WNVINEC.....	SFDKC.....	IFNKP
12	LRYLRS GG.....	SVTDC.....	YLAG
13	ITEVQKPEGRYN.....	TYRGC.....	SGVP

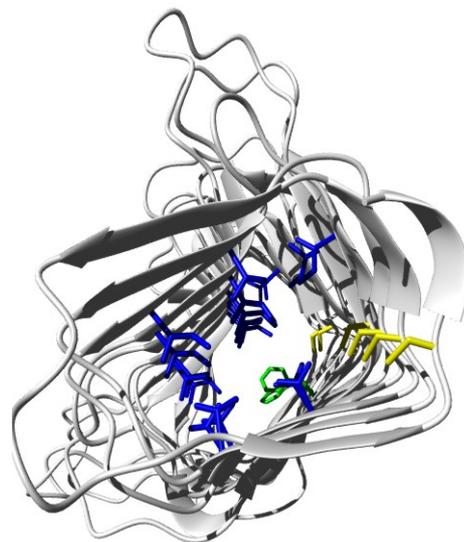


Abbildung 42.

Links: β -Faltblatt-Strukturvergleich einzelner Windungen (*coils*) der β -Helix von Sf6TSP (Gly¹⁹³-Pro⁵⁴⁹). Im parallelen Faltblatt weisen die Aminosäurereste alternierend ins Innere der β -Helix oder nach außen. Entsprechend wurden die β -Stränge konsekutiver Windungen überlagert (rot dargestellt). Gly¹⁹³ in *coil* 0 überlagert nicht mit darunter liegenden Resten (durch Leerstelle markiert). Die *turn*-Bereiche (schwarz dargestellt) wurden nicht in den Vergleich miteinbezogen. Nach innen weisende aliphatische Stapel sind in blau, aromatische Stapel in grün und Cysteinstapel in gelb dargestellt.

Rechts: Blick ins Innere der β -Helix vom C- in Richtung N-Terminus entlang der c-Achse mit den im Strukturvergleich in gleicher Farbe markierten Stapeln.

Val²⁹¹;Val⁴⁴⁹,Val⁴⁷⁹), zwei Isoleucinstapel (Ile⁴²², Ile⁴⁵⁴ und Ile⁴⁷⁰, Ile⁴⁹³) sowie zwei gemischte Stapel aus Isoleucin und Valin (Ile³⁴⁹, Val³⁸³, Val⁴⁰⁶, Ile⁴³⁵, Ile⁴⁶⁸, Val⁴⁹¹; Ile³⁵¹, Val³⁸⁵, Val⁴⁰⁸). Ein kurzer aromatischer Stapel umfasst die Reste Phe³⁰⁸ und Phe³⁸⁶. In der Vertiefung des gebogenen Faltblatts B1 zwischen *turns* T3 und T1 sind im Kristall 31 Wassermoleküle gebunden. Im nativen Trimer ist diese Seite lösungsmittel exponiert und kann als „Rückseite“ des Monomers betrachtet werden. Im Gegensatz dazu bilden das Faltblatt B2, die T2 *turns* und das Faltblatt B3 die „Bauchseite“ des Moleküls. Hier finden die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Ketten im nativen Trimer statt (siehe Abschnitt 4.2.2.). Die rechtshändige parallele β -Helix von Sf6TSP hat einen linksgängigen *twist* mit einem Drehwinkel von 3.7° gemessen zwischen zwei sukzessiven Windungen. Gemessen an den Temperaturfaktoren stellt die β -Helixdomäne den rigidesten und stabilsten Bereich des Proteins dar, mit mittleren B-Werten von 14 \AA^2 (siehe auch Abschnitt 4.1.2. und Abbildung 36).

Zum Auffinden möglicher Sequenzwiederholungen in den einzelnen Windungen der β -Helix wurden ihre Aminosäuresequenzen übereinander gelegt und verglichen (Abbildung 42). Dabei steht die hohe Präferenz zur Stapelbildung von Valin, Isoleucin und Cystein in guter Übereinstimmung mit den für diese Reste vorhergesagten Werten aus amphipathischen nicht helikalen Faltblättern (Bradley *et al.*, 2001). Bei der Strukturvorhersage mit dem Programm BETAWRAP (Bradley *et al.*, 2001) (siehe Abschnitt 1.2.1.) wird die rechtsgängige parallele β -Helix von Sf6TSP zwischen Windung 8 und Windung 12 annähernd richtig vorausgesagt (Tabelle 18).

Tabelle 18. Ergebnis der Analyse der Aminosäuresequenz von Sf6TSP mit dem Programm BETAWRAP (Bradley *et al.*, 2001)^a und Vergleich mit der Röntgenstrukturanalyse.

Wrap #	Rung										Raw Score ^a	P-value ^a
	Rung 1		Rung 2		Rung 3		Rung 4		Rung 5			
	B1^b	B2^b	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2		
1	406	415	435	441	454	468	484	494	511	519	-20.96	0.0014
Windung x-ray	8		9		10		11		12		-	-
	406	415	435	446	468	477	491	500	511	519	-	-

^a <http://betawrap.lcs.mit.edu>, hier wird auch die statistische Relevanz der Daten bewertet.

^b Beginn des ersten β -Strangs (B1) bzw. des zweiten β -Strangs (B2) (Nomenklatur nach Heffron).

Beim Vergleich mit P22TSPAN hat Sf6TSPAN einen höheren Anteil β -Sekundärstruktur in der β -Helixdomäne. Beide Proteine organisieren eine ähnliche Zahl von Resten in jeweils 13 vollständigen Windungen: Sf6TSPAN 388 Aminosäuren, davon 245 (72.5 %) in β -Strängen, P22TSPAN 398 Aminosäuren, davon aber nur 140 (35 %) in β -Strängen. Zusätzlich falten in P22TSPAN 63 Aminosäuren eines T3 *loops* in die so genannte „Rückenflosse“. Während das hydrophobe Innere der β -Helix von Sf6TSPAN kein Wasser enthält, sind im Inneren einer β -Helix von P22TSPAN 12 Wassermoleküle gebunden.

Insgesamt sind die β -Stränge in Sf6TSP somit länger und die *loop* Bereiche kürzer. Dies könnte erklären, warum die Vorhersage der Lage der β -Helix mit BETAWRAP bei Sf6TSP besser funktioniert. Bei P22TSP liegt eine annähernd richtige Registrierung der β -Helix erst auf Platz fünf der von BETAWRAP gemachten Vorschläge. Im Gegensatz zu Sf6TSP wird aber keine Windung richtig zugeordnet und der statistische Fehler (P-Value) ist höher als in Sf6TSP (Daten nicht gezeigt).

4.2.1.3. C-terminale Domäne (Ser⁵⁵⁰-Ile⁶²²)

Am C-terminalen Ende von Sf6TSP führt das einzige *cis*-Prolin (Pro⁴⁴⁹) zu einem Abknicken der Peptidkette von etwa 225° von der Trimerachse. Topologieanalyse mit dem Programm CATH ergibt, dass die C-terminale Domäne zu einem sechsträngigen β -sandwich faltet (Orengo *et al.*, 1997). Dabei alternieren die aufeinander folgenden Stränge I-IV und V-VI zwischen den beiden Faltblättern. In der Verbindung zwischen Strang III und IV findet man eine kurze 3_{10} -Helix. Der Strang VI verläuft aufwärts. Das C-terminale Ile⁶²² nähert sich so bis auf 3 Å Asn⁵⁴⁰ in der untersten Windung der β -Helix. Während die C-terminalen Reste von Sf6TSP unabhängig von den Nachbaruntereinheiten in eine eigenständige Domäne falten, sind die C-terminalen Reste von P22TSP (Ala⁵³⁸-Leu⁶⁶⁶) aller drei Ketten in einer trimeren Domäne miteinander verwunden (siehe Abschnitt 1.3.1.); die Organisation der C-Termini der beiden Tailspikes ist somit nicht vergleichbar.

Da die C-terminalen Reste von Sf6TSP in eine unabhängige Domäne falten, wurden Tertiärstrukturvergleiche mit den Programmen DEJAVU und DALI in Datenbanken durchgeführt (Holm & Sander, 1996; Sierk & Kleywegt, 2004). Dabei werden Sekundärstrukturelemente entsprechen ihrer

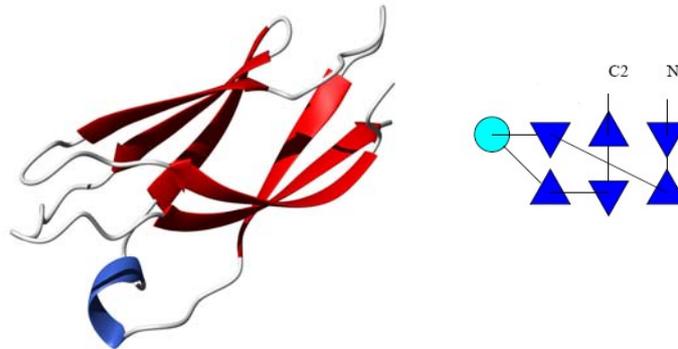


Abbildung 43.

C-terminale Domäne von Sf6TSP (links) mit Topologiedia-gramm (rechts) (erstellt mit dem Programm TOPS, (Michalopoulos *et al.*, 2004)). ∇ β -Strang nach unten, \triangle β -Strang nach oben, \circ α -Helix.

Anzahl an Resten und ihrer Ausrichtung im Raum in Matrizen beschrieben und verglichen. Für die C-terminale Domäne von Sf6TSP umfassen die Treffer mit *rmsd*-Werten unter 2 Å Viruscapsidproteine und Domänen, die mit Membranen oder Lipopolysaccharid interagieren (Tabelle 19). Die Viruscapsidproteine liegen wie die C-terminale Domäne von Sf6TSP an dreizähligen Achsen, die Orientierungen der β -sandwiches relativ zu den dreizähligen Achsen ist jedoch unterschiedlich. Weitere Untersuchungen müssten klären, ob auch die C-terminale Domäne von Sf6TSP eine eigenständige Funktion hat, z.B. bei der Interaktion des Bakteriophagen mit der Wirtszelle. Hauptsächlich ungeladene Reste an der Oberfläche der Domäne könnten auf eine unspezifische hydrophobe Wechselwirkung

mit Membranbestandteilen hindeuten. Eine Funktion der C-terminalen Domäne bei der Trimerstabilisierung wird in Abschnitt 4.2.2.1. besprochen.

4.2.2. Struktur des Trimers

Sf6TSP Δ N liegt in Lösung als biologisch aktives Trimer vor. Die β -Helixdomänen dreier Monomere sind in einem linksgängigen *coiled- β -coil* assoziiert (siehe Abschnitt 4.2.3.). Dabei entsteht im Trimer ein System wassergefüllter Kanäle und Hohlräume, die aber nicht durchgängig miteinander verbunden sind (Abbildung 46). Im Zentrum befinden sich auf der Trimerachse zusätzlich zwei Ca^{2+} -Ionen. Sie koordinieren jeweils an drei Carboxylat-sauerstoffe von drei Glu³⁹⁴-Resten und an drei Wassermoleküle (Abbildung 44).

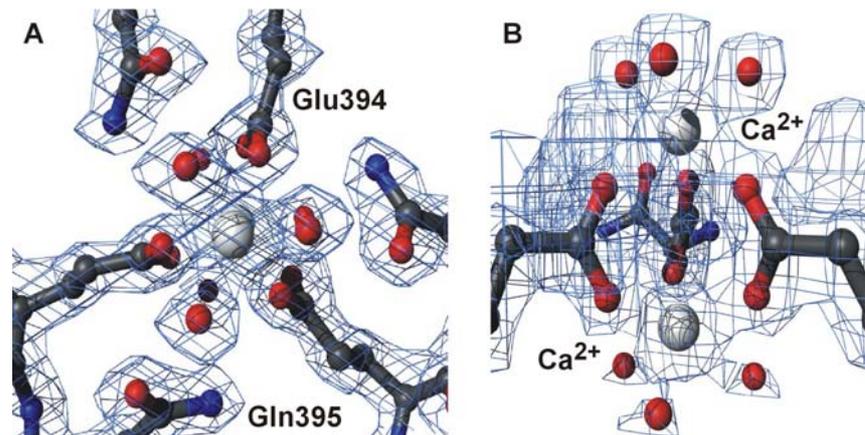


Abbildung 44.

Bindung von zwei Calciumionen auf der Trimerachse von Sf6TSP. A Blick von oben entlang der Trimerachse. B Blick von der Seite. Die Elektronendichte $2F_o - F_c$ ist bei 1σ konturiert.

Die zweite Koordinationssphäre um die Ca^{2+} -Ionen wird von drei Gln³⁹⁵-Resten gebildet. Betrachtet man das System der Wasserkanäle von Sf6TSP Δ N, so ist der innere von den drei β -Helices umgebene Raum nicht von außen zugänglich. Die Ca^{2+} -Ionen können somit nicht mit dem Lösungsmittel austauschen. Wahrscheinlich sind sie bereits bei der Herstel-

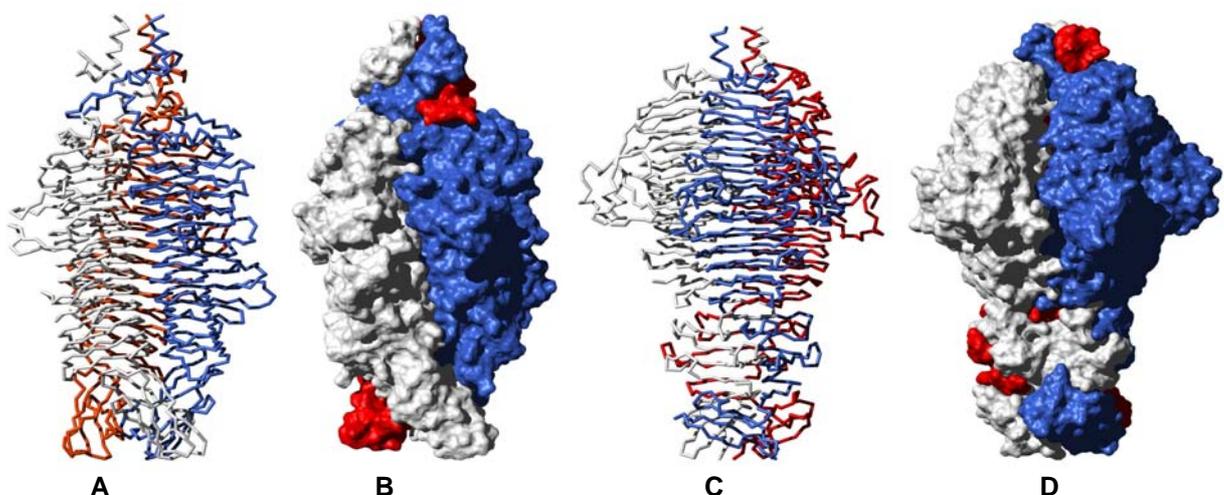
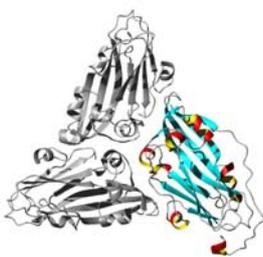
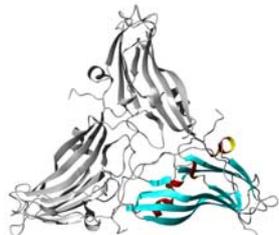
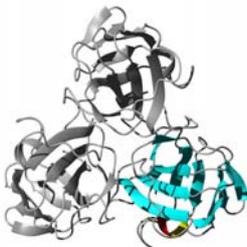


Abbildung 45.

Vergleich der Trimerorganisation in Sf6TSP Δ N (A, B) und in P22TSP Δ N (C, D). Es ist jeweils das Peptidrückgrat und die Raumauffüllung des Trimers als Van-der-Waals-Kontaktfläche mit dem Lösungsmittel gezeigt (berechnet mit MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996)).

Tabelle 19. DEJAVU Tertiärstrukturvergleiche der C-terminalen Domäne von Sf6TSP mit der pdb-Datenbank (Holm & Sander, 1996; Sierk & Kleywegt, 2004). Strukturhomologe Bereiche sind türkis hervorgehoben.

Protein	rmsd / Å ²	Anzahl Reste / gesamt	pdb-Code	Funktion, Bemerkungen
Adaptin Domäne (Coffey <i>et al.</i> , 1998)	1.9	51 / 72	1bw8	Unspezifische Memb- ranwechselwirkung pos- tulierte.
				
Tobacco Ne- crosis Virus Protein (Oda <i>et al.</i> , 2000)	1.8	45 / 219	1c8n	Orientierung des Virus- capsidproteins an der dreizähligen Achse ent- spricht nicht der Anord- nung der Domänen im C- Terminus von Sf6TSP.
				
Turnip Yellow Mosaic Virus Capsid Pro- tein (Canady <i>et al.</i> , 1996)	1.8	45 / 189	1auy	Orientierung des Virus- capsidproteins an der dreizähligen Achse ent- spricht nicht der Anord- nung der Domänen im C- Terminus von Sf6TSP.
				
African Horse Sickness Vi- rus Capsid Protein (Basak <i>et al.</i> , 1996)	1.85	51 / 126	1ahs	Ausrichtung zur dreizäh- ligen Achse ähnlich wie im C-Terminus von Sf6TSP.
				
Bacteriocidal/ Permeability- Increasing Protein (Beamer <i>et</i> <i>al.</i> , 1997)	1.66	35 / 456	1bp1	Bindet und neutralisiert LPS, Bindetasche befin- det sich jedoch nicht in der strukturhomologen Region.
				
Tobacco Ringspot Virus Capsid Protein	2.1	45 / 513	1a6c	(Chandrasekar & Johnson, 1998)
Interleukin-6 Signal Transducer Mem- brane Glycoprotein	1.99	48 / 210	1bqu	(Bravo <i>et al.</i> , 1998)
Bacteriophage T4 gp9	2.9	68 / 288	1qex	(Kostyuchenko <i>et al.</i> , 1999)
Cellulosomal Scaffolding Protein	2.6	68 / 155	1nbc	(Tormo <i>et al.</i> , 1996)
Cowpea Chlorotic Mottle Virus Capsid Protein	2.4	65 / 149	1cwp	(Speir <i>et al.</i> , 1995)

lung in *E.coli* während der Assemblierung der Ketten zum Trimer gebunden worden. Andererseits enthält das Cytosol herkömmlicher *E.coli* Zellen keine signifikanten Konzentrationen an Ca^{2+} -Ionen. Somit hat vermutlich der zur Herstellung der Mutante Sf6TSP Δ NMet(Se) verwendete methioninauxotrophe *E.coli* Stamm B834 Ca^{2+} -Ionen aus dem Minimalexpressionsmedium inkorporiert, dem Kalziumchlorid zugesetzt war. Wäre die Kalziumbindestelle im nativen Protein von außen zugänglich, dann hätten die Ca^{2+} -Ionen schon während der Proteinreinigung in Gegenwart von EDTA ausgetauscht werden können. Es ist auch vorstellbar, dass sonst z.B. Mn^{2+} -Ionen aus dem Kristallisationspuffer gebunden worden wären. In der hochaufgelösten Struktur des nativen Sf6TSP Δ N findet man dagegen an der gleichen Stelle statt zweier Ca^{2+} -Ionen ein einzelnes Mg^{2+} -Ion. Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass für die Herstellung des nativen Proteins der *E.coli* Stamm BL21 im Vollmedium verwendet wurde, das kein Kalziumchlorid enthielt.

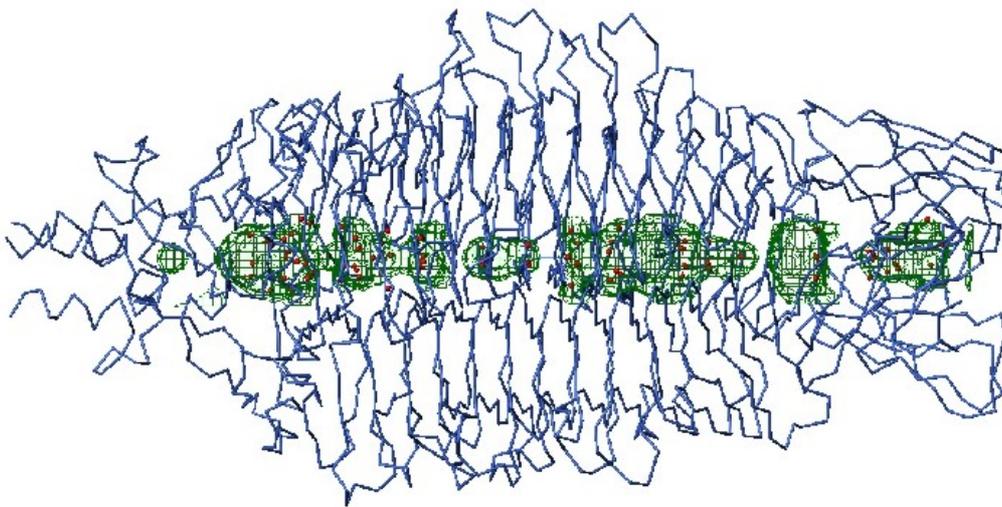


Abbildung 46.

Zentraler Kanal im Trimer von Sf6TSP. In der nativen Struktur befinden sich darin 99 Wassermoleküle (rote Kugeln), obwohl der Kanal nicht durchgängig von außen zugänglich ist. Die Konturen der Hohlräume wurden mit dem Programm SURFNET für einen Testvolumenradius von 1.4 Å berechnet (Laskowski, 1995).

Aus der Kristallstruktur berechnet sich die lösungsmittelzugängliche Oberfläche (*accessible solvent area*, ASA) für das Trimer zu 45502 Å². 30% der ASA eines Monomers (21770 Å²) werden somit bei der Trimerisierung vom Lösungsmittel abgeschirmt. Die Untereinheiten im oligomeren Sf6TSP sind heterolog assoziiert, d.h. symmetriebedingt muss die Interaktion zwischen den Ketten im Trimer jeweils zwischen 2 unterschiedlichen Flächen stattfinden (Monod *et al.*, 1965). Das Faltblatt B2, der Turn B3 und das Faltblatt B3

bilden diese Flächen aus. Im Trimer entstehen so zwei β -sandwiches, dabei sind auf den Interaktionsflächen zu 62 % hydrophobe Reste lokalisiert. Zusätzlich werden zwei intermolekulare Salzbrücken und 21 Wasserstoffbrücken gebildet. Dagegen sind die Interaktionsflächen der β -sandwiches von P22TSP von polaren oder geladenen Resten dominiert (Steinbacher *et al.*, 1997). Der oligomere Zustand in beiden Tailspike Proteinen wird somit über unterschiedliche Arten von Wechselwirkungen stabilisiert. Entsprechend könnten sich in weiterführenden Untersuchungen auch Unterschiede auf den Faltung- und Assemblierungswegen beider Proteine ergeben. Es ist ebenfalls vorstellbar, dass die isolierte β -Helixdomäne von Sf6TSP aufgrund ihrer höheren Hydrophobizität andere Eigenschaften bezüglich Löslichkeit und Oligomerisierungsgrad hat als das analoge Konstrukt Bhx aus P22TSP. Der Einfluss der Struktur des N-terminalen Abschnitts von Sf6TSP Δ N auf die Trimerstabilität wird in Abschnitt 4.2.1.1. diskutiert.

4.2.2.1. C-terminale Domäne von Sf6TSP und Trimerstabilität

Im Trimer von Sf6TSP lagern sich die C-terminalen Domänen vor allem über hydrophobe Wechselwirkungen aneinander. Dabei entsteht entlang der Trimerachse eine trichterförmige, wassergefüllte Höhlung. Zwischen benachbarten Ketten findet man vier intermolekulare Wasserstoffbrücken. Auch die lösungsmittlexponierte Oberfläche im Trimer ist hydrophob. Nur durch Arg⁵⁸¹ entsteht im ansonsten apolaren C-terminalen Ende des Moleküls im Inneren des „Trichters“ eine hohe Konzentration an positiven Ladungen (Abbildung 47C). Man kann lediglich spekulieren, ob diese hydrophobe Oberfläche der C-terminalen Domäne während des Infektionsprozesses des Bakteriophagen eine mögliche Wechselwirkung mit hydrophoben Membranbestandteilen begünstigen würde.

P22TSP faltet dagegen 128 Aminosäuren (Sf6TSP: 73 Aminosäuren) zu einer im Trimer verwundenen C-terminalen Domäne. Die Faltung dieser Domäne ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt auf dem Faltungsweg von P22TSP und wird als „Reifung“ des Protrimers zum nativen Trimer postuliert (Benton *et al.*, 2002). Die isolierte β -Helix Bhx von P22TSP ohne die C-terminale Domäne ist dagegen bei Proteinkonzentrationen von 10 μ g/ml monomer. Nur bei höheren Konzentrationen bildet sie Trimere aus, die aber nicht SDS-resistent sind (Miller *et al.*, 1998a). Gleichfalls wurden in der C-terminalen Domäne von P22TSP letale Mutationen isoliert, die nicht zur Ausbildung von SDS-resistenten Trimeren führen (Schwarz & Berget, 1989). Dies stellt die Frage, ob auch bei Sf6TSP die C-terminale Domäne zur Ausbildung eines stabilen Trimers erforderlich ist. Dabei müsste zwischen der Rolle einer solchen Domäne auf dem Faltungsweg und ihrer Funktion bei der Stabilisierung des nativen Trimers unterschieden werden. Aus anderen viralen, trimeren Faserproteinen sind ebenfalls Domänen bekannt, die für die Trimerausbildung nötig sind, z.B. die *foldon* Domäne aus T4 Fibrin (Tao *et al.*, 1997), die ein α -helikales *coiled-coil* stabilisiert. Für die C-terminale Domäne der kurzen Schwanzfaser des Phagen T4 wird ebenfalls postuliert, dass sie als Registrierungssignal bei der Ausbildung einer Tripel- β -Helix dient (van Raaij *et al.*, 2001). In der trimeren Endosialidase des

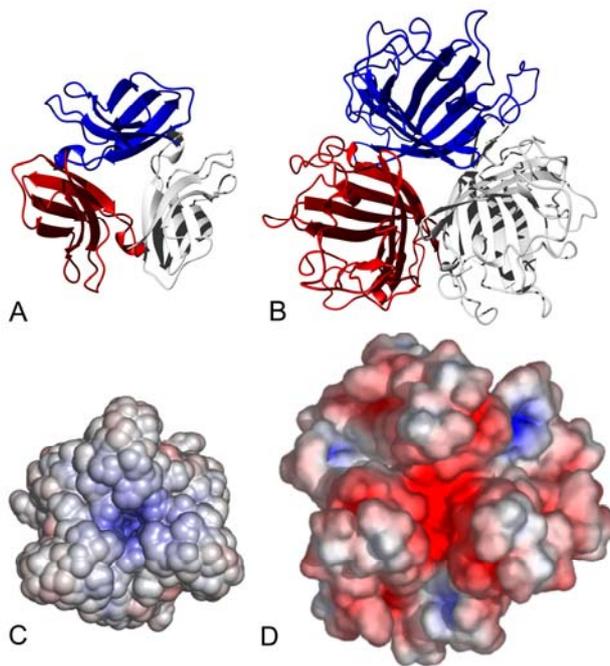


Abbildung 47.

Vergleich der C-terminalen Domäne von Sf6TSP (A) mit der C-terminalen Domäne der Schwanzfaser des Adenovirus Serotyp Ad3 (B) in *cartoon*-Darstellung und mit Oberflächenpotentialen (C, D). Blick entlang der Trimerachsen aus Richtung der Wirtszellen. Die isolierte Ad3-Domäne (pdb-Code 1h7z) ist ein lösliches SDS-resistentes Trimer, sie bindet an den Glykoproteinrezeptor CAR (Durmort *et al.*, 2001). Elektrostatische Potentiale wurden mit dem integrierten APBS-Algorithmus im Programm PyMOL berechnet und bei ± 6 kT eingefärbt (DeLano, 2002).

Obwohl die Topologie der Faltblätter nicht der des β -sandwiches in Sf6TSP entspricht (Daten nicht gezeigt), so ist doch die Ausrichtung zur trimeren Achse ähnlich (Abbildung 47). Von Sf6TSP wurde deshalb ein Konstrukt der C-terminalen Domäne hergestellt (Ser⁴⁴³-Ile⁶²²) (Daten nicht gezeigt). Weiterführende Untersuchungen sollen zeigen, ob es trimere, lösliche SDS-resistente Spezies ausbilden kann. Außerdem könnte an einem Proteinfragment der isolierten β -Helixdomäne von Sf6TSP untersucht werden, ob es in Analogie zu Bhx von P22TSP als gefaltetes Monomer in Lösung vorliegen kann und ob die Anwesenheit der C-terminalen Domäne eine notwendige Bedingung für die Trimerisierung darstellt.

4.2.3. Ist das „triple β -coil“ ein Modell für Amyloidstrukturen?

Die drei β -Helices des Sf6TSP-Trimers sind so gegeneinander verdreht, dass es nahe liegt, sie als Teil einer Super- β -Helix (*coiled β -coil* oder *triple β -coil*) zu bezeichnen. Diese linksgängige Superhelix hätte eine Ganghöhe von 462 Å, etwa dreimal so viel wie in trimeren α -Superhelices (J. Müller, pers. Mitteilung). Bisher sind keine löslichen Proteine

Phagen ϕ K1F ist die C-terminale Domäne notwendig zur korrekten Faltung, wird danach aber proteolytisch abgespalten (Muhlenhoff *et al.*, 2003). Auch die globulären C-Termini der Schwanzfasern von Adenoviren der Serotypen Ad2 und Ad12 sind notwendig für die Trimerisierung der gesamten Faser. Sie bilden als isolierte Domänen lösliche, SDS-resistente Spezies aus (Bewley *et al.*, 1999; Papanikolopoulou *et al.*, 2004a). Der isolierte C-Terminus von Schwanzfasern der Adenoviren des Serotyps Ad3 ist ebenfalls ein SDS-resistentes Trimer. Die Domäne ist mit 191 Aminosäuren deutlich größer als die C-terminale Domäne von Sf6TSP (73 Aminosäuren) und bildet auch ein β -sandwich aus (Durmort *et al.*, 2001). Es bindet an einen Glykoproteinrezeptor. Entsprechend hat Ad3 negative Oberflächenpotentiale an seiner Binde-

bekannt, die β -Superhelices ausbilden. Der Aufbau von Amyloidfasern kann jedoch mit dem von oligomeren β -Helices verglichen werden (siehe Abschnitt 1.2.2.). Man findet in Amyloiden Protofilamente, die der monomeren β -Helix entsprechen könnten. Mehrere von ihnen bauen die Fibrille auf, die ein Analogon zum *coiled β -coil* von Sf6TSP darstellen könnte. Während die einzelne β -Helix in Sf6TSP einen Durchmesser von ca. 30 Å und $-3.7^\circ \text{twist/coil}$ hat, wurden Protofilamente mit Durchmessern von 10-40 Å und mit variierendem *twist* gefunden (Serpell *et al.*, 2000). Die oligomeren Fibrillen haben einen Durchmesser von 100 Å und Längen bis 1500 Å (Khurana *et al.*, 2003). Das native Trimer von Sf6TSP hat dagegen einen Durchmesser von etwa 70 Å. Allgemein ist die Morphologie der Fasern vom Protein abhängig. Z.B. haben die flachen Protofilamente der SH3-Domäne einen Durchmesser von 20 Å, 3-5 dieser Bausteine bilden gedrehte Fasern mit einer Ganghöhe von 580 oder 610 Å aus (Jimenez *et al.*, 1999). Dagegen sind bereits die Protofilamente von Transthyretin gedrehte Bänder mit einer Ganghöhe von 115.5 Å (Blake & Serpell, 1996). Sf6TSP hat somit die Dimension von Amyloidfibrillen, wenngleich seine β -Helices durch *capping* hydrophober Bereiche beidseitig so abgeschirmt sind, dass sie nicht zu langen Fasern assoziieren können.

Neuere kristallographische Untersuchungen zeigen erstmals den molekularen Aufbau eines mikrokristallinen amyloidogenen Peptids aus dem Hefepriion Sup35 (Nelson *et al.*, 2005). Diese *cross- β* -Organisation von parallelen β -Strängen senkrecht zur langen Achse ist mit der in Sf6TSP vergleichbar. Wie innerhalb der β -Helix von Sf6TSP werden die Kontakte zwischen den Faltblättern als *β -sandwich* und wasserfreie Interaktionsfläche gebildet. Außerdem bilden die Sup35-Peptide einen *steric zipper*, d.h. die Seitenketten zweier Faltblätter greifen innerhalb der Interaktionsfläche wie Zähne eines Reißverschlusses ineinander. Dies beobachtet man auch an der Wechselwirkungsfläche zwischen zwei Monomeren von Sf6TSP, allerdings sind hier im Gegensatz zu Sup35 auch Wassermoleküle vorhanden. Aus diesem Vergleich lässt sich schließen, dass Sf6TSP auch auf molekularer Ebene Ähnlichkeiten mit amyloiden Strukturen aufweist. Es kann aber sicher nicht als generelles Strukturmodell für Amyloide verwendet werden. Aufgrund ihrer Hexapeptid-*repeats* wurden linksgängige parallele β -Helices erfolgreicher in Amyloiden modelliert (siehe Abschnitt 1.2.2.). Zumindest zeigen die oligomeren, parallelen rechtsgängigen β -Helices der Tailspike Proteine jedoch mit hoher Primärstrukturvariabilität in jeder einzelnen Windung, dass viele Sequenzen amyloidartigen Strukturmotiven zugänglich sind.

4.3. Untersuchungen zur Identifizierung der Substratbindestelle von Sf6TSP

Sf6TSP ist eine Endorhamnosidase. Das Protein spaltet spezifisch die α -1,3-glykosidische Bindung zwischen zwei Rhamnoseeinheiten. Basierend auf der Kristallstruktur sollten in dieser Arbeit die Substratbindestelle und das aktive Zentrum für die Endorhamnosidaseaktivität von Sf6TSP gesucht werden.

4.3.1. Bindungs- und Aktivitätsstudien an Sf6TSP

Der Aktivitätstest von Sf6TSP beruht auf der Quantifizierung von fluoreszenzgelabelten Oligosacchariden nach enzymatischer Spaltung (Freiberg *et al.*, 2003). Dazu wird ein mit 7-Aminomethylkumarin gelabeltes Dodekasaccharid (DodAmc) eingesetzt, das von Sf6TSP in ein ungelabeltes Oktasaccharid und ein gelabeltes Tetrasaccharid (TetAmc) gespalten wird. DodAmc und TetAmc können mittels *reversed phase* HPLC getrennt und so die Produktkonzentrationen zu verschiedenen Zeiten bestimmt werden: Bei 40°C und 0.45 μ M Proteinkonzentration wird eine 2.2 μ M Lösung von DodAmc mit einer Rate

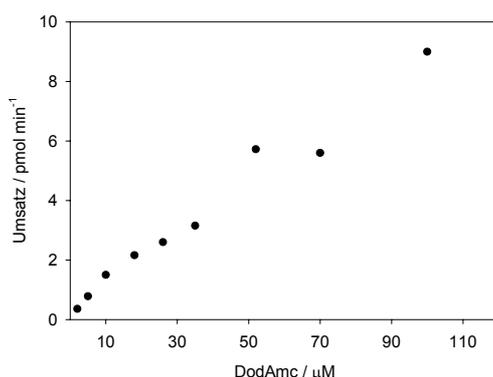


Abbildung 48.

Hydrolyse eines 7-Aminomethylkumarinmarkierten Dodekasaccharids (DodAmc) durch Sf6TSP bei 15 °C. Abhängigkeit der Substratkonzentration vom Umsatz. Die Sf6TSP Untereinheitenkonzentration beträgt 150 nM.

von 0.13 s⁻¹ gespalten. Bei Lösungen gleicher Konzentration von Dekasaccharid (DeAmc) und Oktasaccharid (OktAmc) waren die Hydrolyseraten etwa 100fach erniedrigt (Freiberg *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu P22TSP konnte jedoch kein Fluoreszenzquench bei der Zugabe von Oligosacchariden festgestellt werden (Alexander Freiberg, pers. Mitteilung). Auch zeigten Vorversuche zur Fluoreszenzdepolarisation mikromolarer Lösungen von OktAmc bei Bindung von Sf6TSP kein über dem Rauschen signifikantes Bindungssignal, ebenso wenig wie Versuche, mit isothermer Titrationskalorimetrie zur Bindung von ungelabel-

tem Oktasaccharid an Sf6TSP (Freiberg, 2000). Es sollte deshalb die Michaelis-Konstante der Hydrolyse von DodAmc mit Sf6TSP bestimmt werden. Bei den dafür durchgeführten Hydrolyseexperimenten von DodAmc zeigte sich jedoch grundsätzlich bei allen Substratkonzentrationen ein bei *turnover* Raten von ca. 3 % abknickender Kurvenverlauf. Für dieses Phänomen konnte bislang keine Erklärung gefunden werden. Dabei wurde stets im mindestens hundertfachen molaren Überschuss von Zucker bezogen auf molare Konzentrationen an Proteinuntereinheiten gearbeitet und es wurden verschiedene Chargen DodAmc getestet. Zur Messung von Anfangsgeschwindigkeiten wurden deshalb nur Messpunkte unterhalb von *turnover* Raten von 3 % herangezogen. Bei den im Experiment ma-

ximal eingesetzten Substratkonzentrationen von 0.1 mM war jedoch aus dem Kurvenverlauf kein Erreichen einer Maximalgeschwindigkeit erkennbar (Abbildung 48). Da die Menge an DodAmc limitiert war, wurden keine höheren Konzentrationen im millimolaren Bereich eingesetzt, so dass aus der DodAmc-Hydrolyse kein K_M -Wert abgeschätzt werden konnte. Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen sind im allgemeinen schwächer als Protein-Protein-Interaktionen. Für die Bindung oligomerer Saccharide an Lektine erhält man Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich (Laederach & Reilly, 2005). Auch an P22TSP binden Okta- und Dodekasaccharide mit K_D -Werten von 1 μ M bzw. 2 μ M (Baxa *et al.*, 1996). Die Bindung von Kohlenhydratsubstraten an Sf6TSP ist somit schwächer als bei P22TSP und kann vermutlich nur unter Zuhilfenahme inaktiver Mutanten oder mit längeren Oligosacchariden charakterisiert werden.

4.3.2. Mutationsstudien an Sf6TSP

4.3.2.1. Auswahl von Mutationspositionen

Um eine Bindestelle auf dem trimeren TSP zu lokalisieren, wurden basierend auf der Kristallstruktur Reste ausgewählt, die an der Bindung und Hydrolyse des Polysaccharids substrates beteiligt sein könnten. Für die Hydrolyse der glykosidischen Bindung werden zwei katalytische Aminosäuren benötigt, die als nukleophile Base und als Säure, d.h. als Protonendonoren dienen. Prinzipiell kommen dabei Glutamat- und Aspartatreste in Frage. Der Abstand dieser Reste beträgt bei konfigurationserhaltendem Hydrolysemechanismus ca. 5.5 Å. Bei Inversion der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff muss der Abstand ca. 10 Å betragen (Davies & Henrissat, 1995). Zusätzlich wird das Zuckermolekül oft durch hydrophobe Wechselwirkung der Pyranoseringe mit aromatischen Seitenketten positioniert.

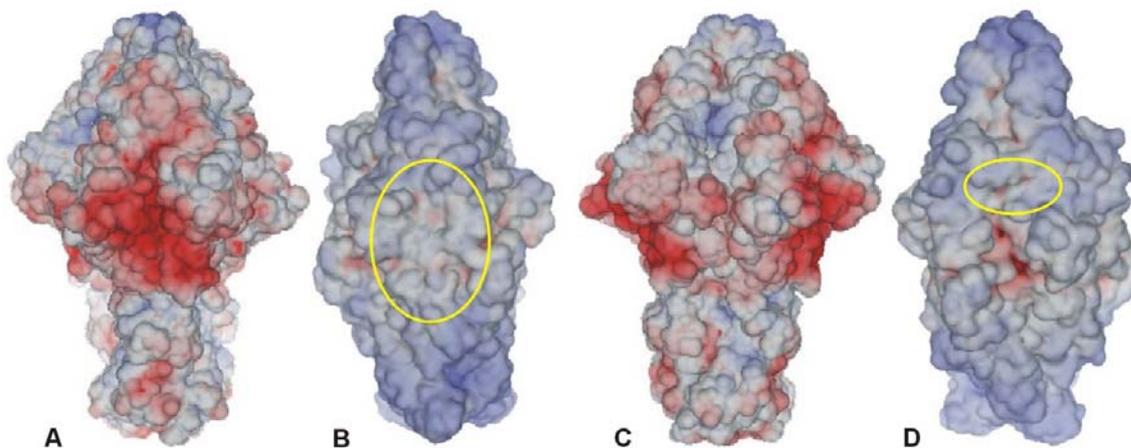


Abbildung 49.

Oberflächenpotentiale von P22TSP (A,C) und Sf6TSP (B,D). Blick auf die lösungsmittelpotentielle Seite einer Untereinheit (A,B) und in die Grube zwischen den Untereinheiten (C,D). Bei Sf6TSP sind die Regionen, in denen mit Punktmutationen das aktive Zentrum gesucht wurde, gelb markiert. Potentiale wurden mit dem integrierten APBS-Algorithmus im Programm PyMOL berechnet (DeLano, 2002). Die stärkste Schattierung in rot und blau entspricht Potentialen von ± 10 kT.

Auf der Suche nach dem aktiven Zentrum von Sf6TSP wurde zunächst mit der Bindungsstelle von Oligosacchariden an P22TSP verglichen. Diese ist durch Röntgenstrukturanalyse der Komplexe von P22TSP mit Oktasacchariden der *Salmonella*-O-Antigene aus *S. typhi*^{253Ty}, *S. typhimurium* und *S. enteritidis* charakterisiert worden (Steinbacher *et al.*, 1996; Steinbacher *et al.*, 1997). Es bindet parallel zur Trimerachse an eine monomere Untereinheit, dabei weist das reduzierende Ende zum C-Terminus. *Loops* vom Typ T1 und T3 der β -Helix bilden dafür eine Grube auf dem „Rücken“ des Monomers aus, in der die Bindestelle lokalisiert ist (Abbildung 49; siehe auch Abschnitt 1.3.2.). Eine Rhamnose-Einheit am reduzierenden Ende des Oktasaccharids bindet an die katalytischen Reste Asp³⁹² sowie, über ein Wassermolekül, an Asp³⁹⁵ und Glu³⁵⁹. Für die enzymatische Reaktion wird wegen der Substratpositionierung ein invertierender Mechanismus vorgeschlagen, obwohl die Abstände der beteiligten katalytischen Reste kleiner sind als die bei Konfigurationsumkehr üblichen 9-10 Å (Steinbacher *et al.*, 1997). Mutationen der drei katalytisch wirksamen Reste reduzieren die Enzymaktivität 10.000 bis 30.000fach (Baxa *et al.*, 1996). Die Trimerisierung von P22TSP ist dabei keine Voraussetzung für Endorhamnosidaseaktivität. Auch für die isolierte β -Helixdomäne Bhx konnte noch 0.2% der enzymatischen Aktivität des nativen Trimers nachgewiesen werden (Miller *et al.*, 1998a).

Auf dem „Rücken“ von Sf6TSP fehlt dagegen eine gleichermaßen tief ausgeprägte Grube wie in P22TSP. Dies ist vor allem auf kürzere T1 und T3 *loops* zurückzuführen. Negative elektrostatische Oberflächenpotentiale, die mit dem Auftreten von Aspartat- und Glutamatresten einhergehen, deuteten jedoch zunächst auf Bereiche hin, in denen die katalytischen Reste des aktiven Zentrums lokalisiert sein könnten (Abbildung 49B). Daraufhin wurden für eine erste Serie von sieben Mutanten die Aminosäureaustausche E295Q, D344N, E345Q, D387N, E409Q, E430Q und E471Q vorgenommen (Abbildung 50B). Die Abstände der Carboxylsauerstoffe zwischen Paaren dieser Säurereste betragen, entsprechend einem invertierenden Hydrolysemechanismus, ca. 10 Å.

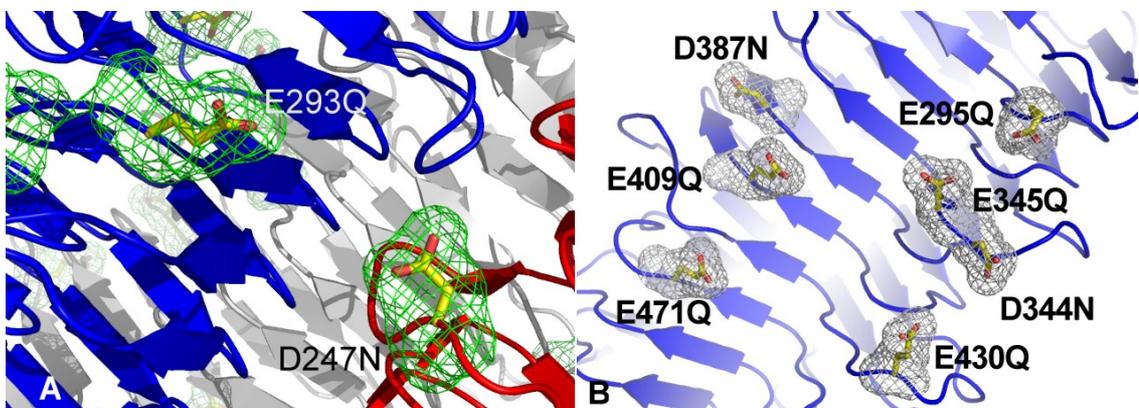


Abbildung 50.

Mutationspositionen auf Sf6TSP zum Auffinden der Substratbindestelle. Die bezeichneten Säurereste am Interface zwischen den Untereinheiten (A) oder auf dem Rücken eines Monomers (B) wurden einzeln gegen die entsprechenden Säureamide ausgetauscht. Siehe auch Abbildung 49, B und D.

4.3.2.2. Kokkristallisation von Sf6TSPAN mit Oktasaccharid

Zur Lokalisierung der Bindestelle für Oligosaccharide an Sf6TSPAN wurden Versuche zur Kokkristallisation mit dem weniger hydrolyseempfindlichen Oktasaccharid durchgeführt. Unter den bekannten Kristallisationsbedingungen (siehe Abschnitt 4.1.1.) wurden in Gegenwart des nicht markierten Zuckers nach einer Woche Kristalle erhalten, die nach einer weiteren Woche eingefroren wurden. In diesen zwei Wochen wurde aber vermutlich trotz der 100fach verlangsamten Hydrolysegeschwindigkeit alles Oktasaccharid gespalten. Diese Abschätzung ergibt sich folgendermaßen: Legt man für DodAmc anhand des unvollständigen Michaelis-Menten Verlaufs eine maximale Hydrolysegeschwindigkeit von 15 pmol/min zugrunde, so beträgt die maximale Geschwindigkeit für das Oktasaccharid ca. 0.15 pmol/min. 3 nmol Zucker im Kristallisationsansatz werden so in 2 Wochen vollständig verbraucht.

Tabelle 20. Datensätze für Sf6TSPAN kokkristallisiert mit Shigella Oktasaccharid.

Röntgenexperiment	HOME DTB MAR345	BESSY-BL2 DTB MAR345
Temperatur / K	110	100
Wavelength / Å	1.542	0.8984
Datenauswertemethode	DENZO/SCALEPACK	XDS
Raumgruppe	R3	R3
Auflösung / Å	15-3.0	50-1.7
Reflexe einmalig / gemessen	31536/12230	438914/66969
Vollständigkeit	99.5/100.0	98.5/92.3
alles / letzte Schale <I/σ(I)>	14.5/8.6 (3.19-3.00)	13.5/3.8
alles / letzte Schale R _{sym} / %	5.3/10.0	9.5/34.8
alles / letzte Schale Mittlere Redundanz	2.6	6.6
B / Å ²	49	24.9
Mosaizität / °	0.63	0.24
Zellkonstanten a, c / Å	95.553/181.835	95.530/181.662

Die Datenaufnahme gestaltete sich jedoch insofern schwierig, als dass zunächst ein Datensatz mit Cu-K- α -Strahlung bis zur Auflösung von 3 Å gemessen wurde. Vom gleichen Kristall wurde nochmals mit Synchrotronstrahlung ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 1.7 Å gesammelt (Tabelle 20). Bei höherer Auflösung zeigten sich hier die überlappenden Reflexe eines Zwillingskristalls. Beide Datensätze wurden daraufhin nur bis zu einer Auflösung von 3 Å mittels molekularen Ersatzes mit dem Modell für Sf6TSPAN ausgewertet. Aus beiden Messungen erhielt man widersprüchliche Ergebnisse: Im ersten Experiment wurde Differenzdichte gefunden, die in Übereinstimmung mit obigen Überlegungen einem Tetrasaccharid zugeordnet werden könnte (Daten nicht gezeigt). Die zweite Messung reproduzierte diese Differenzdichte jedoch nicht. Damit war zunächst

unklar, ob die beobachtete zusätzliche Elektronendichte von einem spezifisch gebundenen Zuckerbaustein herrührt.

Die Orientierung eines potentiell kokristallisierten Tetrasaccharids konnte bei 3 Å Auflösung nicht näher bestimmt werden. Die Differenzdichte liegt jedoch im Unterschied zu den obigen Überlegungen nicht auf dem „Rücken“ eines Monomers, sondern in der Grube zwischen den Untereinheiten (Abbildung 49D). In räumlicher Nähe befinden sich die zwei Säurereste D247 und E293. Der kürzeste Abstand der Carboxylsauerstoffe beträgt zwischen diesen beiden Resten ca. 9.5 Å. Entsprechend der Lage der Differenzdichte wurden darum zwei weitere Mutanten hergestellt, D247N und E293Q (Abbildung 50A). Nach Abschluss der Experimente für diese Arbeit wurde für einen weiteren, nicht verzwilligten Kristall aus dem gleichen Kristallisationsexperiment ein Datensatz bis 2.05 Å Auflösung gesammelt. Hier zeigte die Differenzdichte deutlich ein Tetrasaccharid an der Position zwischen Asp²⁴⁷ und Glu²⁹³ (J. Müller, pers. Mitteilung).

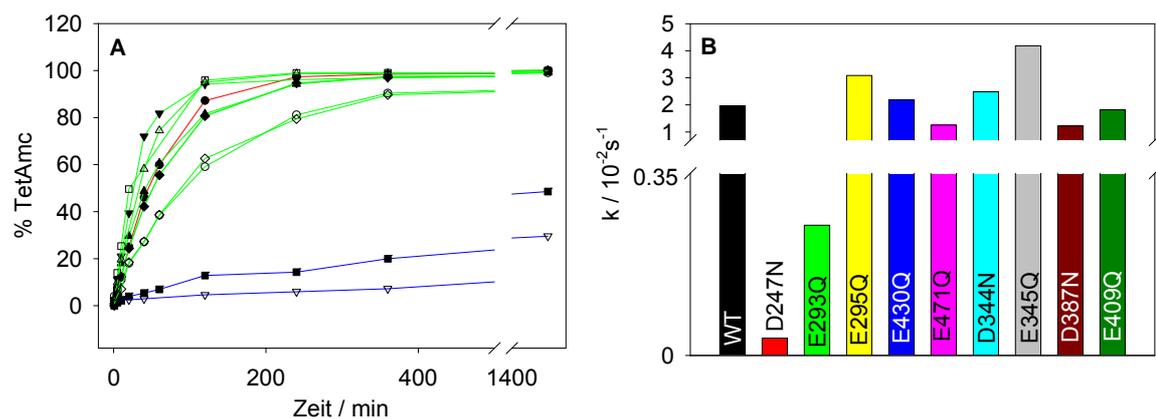


Abbildung 51.

Aktivitätstest von Mutanten von Sf6TSP Δ N (20 μ g/ml) in Gegenwart von 2 μ M DodAmc. A. Produktion des fluoreszenzmarkierten Tetrasaccharids (TetAmc), prozentualer Anteil der Peakfläche nach *Reversed Phase* HPLC des Produktgemisches. WT Kontrolle (rote Linie, gefüllte Kreise). Mutanten mit Wildtypaktivität (grüne Linien): E345Q (gefüllte Dreiecke nach unten), D344N (Dreiecke offen nach oben), E345Q (Quadrate offen), E430Q (gefüllte Dreiecke nach oben), E471Q (offene Kreise), D378N (gefüllte Rauten), E409Q (offene Rauten). Mutanten mit geringerer Aktivität als beim WT (blaue Linien): D247N (offene Dreiecke nach unten), E293Q (gefüllte Quadrate). B. Anfangsgeschwindigkeiten der DodAmc-Hydrolyseexperimente aus A bis 30 % Umsatz.

4.3.2.3. Aktivitätstests der Mutanten

Alle neun Mutanten von Sf6TSP Δ N konnten in *E.coli* BL21(DE3) löslich überexprimiert werden. Zum Vergleich der Aktivitäten der Mutanten wurde die Hydrolysegeschwindigkeit von DodAmc wie beschrieben gemessen (siehe Abschnitt 4.3.1.). Zunächst wurden Versuche unternommen, Aktivitätstests mit DodAmc und Zelllysaten durchzuführen. Gesamtproteinkonzentrationen wurden nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Da jedoch die Proteinmengen im Zelllysate je nach Expressionsrate der Mutan-

ten leicht variierten, konnten keine identischen Tailspikekonzentrationen eingestellt werden. Somit ließen sich die Hydrolysegeschwindigkeiten nicht quantitativ vergleichen. In diesem Test waren jedoch alle neun Mutanten aktiv (Daten nicht gezeigt). Die Aktivitätstests wurden daraufhin mit den nach dem Wildtypprotokoll gereinigten Proteinen durchgeführt und die Hydrolyseraten bis 30 % TetAmc-Bildung berechnet und verglichen. Dabei zeigten alle Proteine mit Mutationen, die auf dem „Rücken“ der β -Helixdomäne lokalisiert waren, mit dem Wildtyp vergleichbare Aktivität. Dagegen zeigten die Mutanten D247N und E293Q, die aufgrund der Kokristallisationsexperimente entworfen wurden, deutlich verminderte Aktivität. Während der Wildtyp bei 15 °C 2 μ M DodAmc mit einer Rate von $19.6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ hydrolysiert, beträgt die Rate für E293Q nur ca. 13 % ($2.5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), die für D247N sogar nur ca. 1.5 % ($0.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) der Hydrolyseaktivität des Wildtyps.

Vergleicht man mit P22TSP so wäre bei einer Mutation eines direkt an der Spaltung beteiligten katalytischen Rests eine stärkere Abnahme der Aktivität zu erwarten. Die Mutation jeweils eines der drei katalytischen Reste in P22TSP senkt die Aktivität auf weniger als 0.01 % des Wildtyps. Vermutlich sind die Reste E293Q und D247N daher an der Bindung aber nicht an der Spaltung des Oligosaccharids beteiligt. Die Ergebnisse sprechen jedoch für die Lage des aktiven Zentrums in der Grube zwischen den Untereinheiten. Entsprechend müssten separate Untereinheiten inaktiv sein. Bei P22TSP lässt sich dagegen für die monomere β -Helix Bhx noch Aktivität messen (Miller *et al.*, 1998a). Es könnte auch sein, dass ein einzelner Aminosäureaustausch nicht ausreicht. Bei der Endosialidase K1F bewirkt erst der gleichzeitige Austausch von zwei Resten die völlige Inaktivität des Proteins. Wird nur ein Rest der drei Reste des aktiven Zentrums ausgetauscht, ist noch eine Restaktivität von < 5 % messbar (Stummeyer *et al.*, 2005). Dies müsste auch bei Sf6TSP für die Reste Glu²⁹³ und Asp²⁴⁷ mit einer Doppelmutante untersucht werden.

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Tailspike Proteine der Bakteriophagen Sf6 und HK620 mit dem gut charakterisierten Tailspike Protein des Bakteriophagen P22 im Hinblick auf die Struktur und die Funktion als Endoglykosidasen verglichen. Alle drei Proteine stammen aus Phagen der gleichen Morphologiekategorie *Podoviridae* und sind nicht sequenzhomolog. Es konnte gezeigt werden, dass die dreidimensionale Struktur der Tailspike Proteine stärker konserviert ist als ihre Aminosäuresequenz. Damit wird die evolutionäre Verwandtschaft der Phagen auch auf Proteinebene bestätigt. Es war bereits bekannt, dass P22TSP zu einer rechtsgängigen, parallelen β -Helix faltet. HK620TSP wurde bezüglich seiner hydrodynamischen und spektroskopischen Eigenschaften charakterisiert. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu P22TSP wurde ebenfalls eine rechtsgängige parallele β -Helix postuliert. Mit Röntgenkristallstrukturanalyse wurde bestätigt, dass auch Sf6TSP zu diesem Strukturmotiv faltet. Die parallele β -Helix ist in besonderem Maße geeignet, die Variabilität der Aminosäuresequenzen aufzunehmen, wie sie durch die schnelle Mutation von Phagenenomenen entsteht. Die Tailspike Proteine sind die einzigen Beispiele oligomerer Proteine mit rechtsgängiger β -Helix. Ein Einfluss der Architektur der Trimerisierungsdomäne auf die hohe Stabilität der Tailspike Proteine muss jedoch neu bewertet werden. In Sf6TSP sind die einzelnen Peptidketten nicht wie in P22TSP intermolekular verdrillt, was bisher als Grund für die hohe Stabilität von P22TSP angesehen wurde. Im Bereich der parallelen β -Helix befindet sich auch das aktive Zentrum der Tailspike Proteine. Die große Sequenzheterogenität führt hier zu unterschiedlichen Positionen der Bindestelle. Während sie bei P22TSP auf einer einzelnen Untereinheit lokalisiert ist, wurde mit Kokristallisations- und Mutationsexperimenten für Sf6TSP eine Position zwischen den Untereinheiten postuliert. Tailspike Proteine könnten somit als Modellsystem für die Evolution von Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen verwendet werden. Für weitergehende Untersuchungen wurde deshalb die bis dahin noch unbekannte Struktur des Kohlenhydratrezeptors von HK620TSP und die enzymatische Spezifität des Proteins analysiert. Es handelt sich bei HK620TSP um eine N-Acetylglucosaminidase, wohingegen Sf6TSP und P22TSP Endorhamnosidasen sind.

Röntgenkristallstrukturanalyse des Tailspike Proteins von Sf6

Der Kristallisation von Sf6TSP ist nur ein C-terminales Fragment Sf6TSP Δ N zugänglich. Dies wurde in vorausgehenden Arbeiten gezeigt. Ebenso wurde gefunden, dass das vollständige Protein inklusive der über einen flexiblen *linker* verbundenen Kopfbindedomäne nicht kristallisiert (Freiberg *et al.*, 2003). Dies wurde auch bei anderen viralen Faserproteinen beobachtet, von denen nur die rigiden Bereiche kristallisiert werden konnten (Mitraki *et al.*, 2002; Weigele *et al.*, 2003). Außerdem traten häufig verzwilligte Kristalle auf, die die Datenaufnahme erschwerten. Schließlich war wegen der geringen Sequenzhomologie zu P22TSP die Phasierung eines nativen Datensatzes mithilfe von mole-

kularem Ersatz unmöglich. In dieser Arbeit konnte mit modifizierten Kristallisationsbedingungen jedoch das Auftreten von Zwillingen vermindert werden. Die Herstellung und Kristallisation einer Selenomethioninmutante ermöglichte die Phasierung mit der SAD-Methode. Damit wurde ein Strukturmodell für Sf6TSPAN mit einer Auflösung von 1.98 Å gebaut.

Sf6TSP faltet zu einer trimeren, parallelen, rechtsgängigen β -Helix. Diese Domäne wird flankiert von einem N-terminalen Helix-loop-Helix-Motiv und einem C-terminalen β -sandwich. Obwohl es rund 40 Aminosäuren weniger als P22TSPAN aufweist, hat Sf6TSPAN die gleiche Länge von 135 Å. Diese konservierte Gesamtlänge könnte auf ein allgemeines Prinzip beim Infektionsprozess des Phagen hindeuten und ist eventuell an die Dimensionen der Zellwände gramnegativer Bakterien adaptiert. Die β -Helix-Domäne von Sf6TSPAN hat einen höheren β -Strukturgehalt als in P22TSPAN, dies wird mit kürzeren loops zwischen den Faltblättern realisiert. Außerdem sind, im Gegensatz zu P22TSPAN, die drei β -Helices im Trimer linksläufig gegeneinander verdreht. Die cross- β -Architektur von Sf6TSP spiegelt sich bereits in den Röntgenbeugungsbildern wider. Die Wilson Statistik zeigt eine starke Anisotropie der Reflexverteilung parallel zur c^* -Achse, dies weist darauf hin, dass die β -Helix parallel zur dieser Achse liegt (J.Müller, pers. Mitteilung). Hier findet man besonders intensive Reflexe bei 4.7 Å. Dies ist die charakteristische meridionale Position von Reflexen, die auch bei der Röntgenbeugung an amyloiden Fasern gefunden wird (Sunde & Blake, 1998). Sie entsteht durch den regelmäßigen Abstand der einzelnen β -Stränge in den lang gestreckten Faltblättern.

Am N-Terminus von Sf6TSPAN findet man wie in P22TSPAN ein Drei-Helix-Bündel, es trägt allerdings zusätzlich die Insertion eines *hairpin loops* von 30 Aminosäuren. Es ist unklar, ob im Laufe der Evolution der Phagen dieser Genabschnitt eines gemeinsamen Vorfahren bei Sf6TSP inseriert wurde oder ob er bei P22TSP verloren gegangen ist. Für ein Drei-Helix-Bündel hat sich an dieser Stelle jedoch keine strukturelle Alternative entwickelt, die, ähnlich den schmalen α -Helices im Trimer, der Bewegung der Kopfbindedomäne genügend Spielraum bietet. Auch C-terminal der β -Helix ist Sf6TSP anders organisiert als P22TSP. In P22TSP sind die Peptidketten im Trimer miteinander verwunden, diese Verflechtung wurde bislang für die hohe Stabilität von P22TSP verantwortlich gemacht (Benton *et al.*, 2002). In Sf6TSP sind dagegen drei β -sandwich-Domänen lateral assoziiert. Trotzdem ist Sf6TSP ähnlich stabil wie P22TSP (Freiberg *et al.*, 2003). Somit wird die genomische Mosaizität der Tailspike Proteine hier auf Strukturebene sichtbar. In den mosaikartigen Phagengenomen alternieren die Regionen mit hoher und geringer Sequenzhomologie. Die Funktionen einzelner Genabschnitte sind jedoch unabhängig davon konserviert (Casjens *et al.*, 2004). Tailspike Proteine sind durch ihren oligomeren Zustand stabilisiert (Miller *et al.*, 1998a). Um diese hohe Stabilität zu erhalten haben P22TSP und Sf6TSP im Laufe der Zeit unterschiedliche Trimerisierungsdomänen akquiriert. Es bleibt aber unklar, ob die C-terminale Domäne darüber hinausgehende Funktionen bei der

Wechselwirkung mit der Wirtszelle hat. Viele virale Fasern tragen an der der Wirtszelle zugewandten Seite ihre Rezeptorbindestelle, wie z.B. die Adenoviren (Bewley *et al.*, 1999) oder das stäbchenförmige Hämagglutinin mit Rezeptorbindestelle mit *jelly-roll fold* an der Spitze des Moleküls (Weis *et al.*, 1988).

Die hohe Strukturhomologie von P22TSP und Sf6TSP ist auch die Ursache ihrer biochemischen Ähnlichkeit. Die oligomere, parallele β -Helix wurde zunächst nur anhand des Vergleichs der spektroskopischen und hydrodynamischen Eigenschaften der Tailspike Proteine von P22 und Sf6 postuliert (Freiberg *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der Kristallstrukturanalyse von Sf6TSP rechtfertigen diese Vorgehensweise auch für andere evolutiv verwandte, aber nicht sequenzhomologe Funktionseinheiten von Bakteriophagen.

Biochemische Charakterisierung des Tailspike Proteins von HK620

Unter den lambdoiden Phagen sind sich HK620 und Sf6 besonders ähnlich. 43 % des Genoms von HK620 ist homolog zu Sf6 (Casjens *et al.*, 2004). Allerdings weisen diese ähnlichen Regionen eine hohe Mosaizität auf. Auch das Tailspike Protein von HK620 ist bezüglich seiner Aminosäuresequenz ein Mosaik aus der konservierten Kopfbindingdomäne und einem nicht homologen Teil, der mit dem Wirtszellrezeptor interagiert. In Analogie zum Vorgehen bei Sf6TSP (Freiberg *et al.*, 2003) sollte deshalb HK620TSP biochemisch charakterisiert werden, um Aufschluss über eine mögliche strukturelle Homologie zu P22TSP und Sf6TSP und über das Vorhandensein einer parallelen, rechtsgängigen β -Helix zu erlangen.

Das Tailspike Protein des Bakteriophagen HK620 wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals kloniert und nach Standardprotokollen für Tailspike Proteine gereinigt. Die analytische Ultrazentrifugation zeigte, dass es sich bei dem Protein um ein natives Trimer handelt. HK620TSP hat das typische Fern-UV-CD-Spektrum für Proteine mit β -Faltblatt-Sekundärstruktur und ist hitze- und protease-, sowie, bei Raumtemperatur, SDS-resistent. Damit zeigt HK620TSP die charakteristischen Merkmale bezüglich der Stabilität und des Oligomerisierungsgrades, wie sie auch für P22TSP und Sf6TSP gefunden wurden. Dagegen lassen sich aus der Fourier Transform Infrarotspektroskopie keine Rückschlüsse auf das Vorhandensein einer β -Helix in HK620TSP ziehen. Das übliche Modell zum Fit der Spektren bezüglich der Beiträge einzelner Sekundärstrukturelemente eignet sich nicht zur korrekten Vorhersage des β -Strukturgehalts der Tailspike Proteine, da es diesen üblicherweise zu hoch einschätzt (Freiberg *et al.*, 2003; Khurana & Fink, 2000). Lediglich bei Sf6TSP ist die Vorhersagegenauigkeit vermutlich zufällig hoch, weil die β -Helix und auch der C-terminale *sandwich* einen hohen β -Strukturgehalt haben. Beim Erhitzen von HK620TSP in Gegenwart von SDS lässt sich ein thermisches Entfaltungsintermediat populieren. Es handelt sich dabei um das Protein mit entfaltetem N-Terminus, der der limitierten Proteolyse bis Lys¹⁰⁸ zugänglich ist. Auch in P22TSP ist unter entsprechenden Bedingungen gegenüber proteolytischer Prozessierung ab Tyr¹⁰⁸ stabil (Chen & King, 1991).

Die limitierte Proteolyse zeigt somit die gleiche Domänengrenze wie sie beim Vergleich der Aminosäuresequenzen sichtbar wird. Ohne Strukturinformation ist jedoch nicht endgültig zu klären, ob in HK620TSP an dieser Stelle im genetischen Mosaik eine andere Domäne eingebaut wurde, oder ob die nun folgenden Sequenzen, da sie funktionell nicht mehr in Protein-Protein-Interaktionen eingebunden sind, eine höhere Mutationsrate aufweisen. Dieser auf die Kopfbindingdomäne folgende Teil ist ähnlich stabil gefaltet wie die entsprechenden Sequenzen in Sf6TSP und P22TSP (Freiberg *et al.*, 2003). Damit ist auch die Stabilität dieser Domänen in allen drei Tailspike Proteinen im Gegensatz zur Aminosäuresequenz stark konserviert und ein weiteres Indiz für das Vorhandensein der parallelen β -Helix in HK620TSP. Die Labilität der Kopfbindingdomäne im Vergleich zum übrigen Tailspike Protein ist durch ihre Funktion bestimmt, an das Kapsid binden zu müssen und bei der Assemblierung andere Proteine zu erkennen (Tang *et al.*, 2005). Demzufolge wurde bei HK620TSP beobachtet, dass das Volllängenprotein leichter an hydrophobe Oberflächen adsorbiert als die verkürzte Variante. Schließlich ist auch beim HK620TSP die Funktion als Lipopolysaccharid-abbauende Endoglykosidase konserviert. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein O-Antigen-*repeats* vom Typ O18A1 seiner Wirtszelle *E.Coli* H erkennt und vom Lipopolysaccharid abspaltet. Dabei entstehen ähnlich lange Produkte wie bei Sf6TSP und P22TSP. Dies deutet auf eine ähnliche Architektur der Bindestelle vermutlich im Bereich der parallelen β -Helix hin. Funktionell handelt es sich damit bei HK620TSP um eine N-acetylglucosaminidase, im Gegensatz zu Sf6TSP und P22TSP, die Endorhamnosidasen sind. Interessanterweise spaltet HK620TSP jedoch am nicht reduzierenden Ende einer Rhamnoseinheit auf der Hauptkette des O18A1-Antigens. Man kann spekulieren, ob der gemeinsame Vorfahre der Tailspike Proteine ebenfalls eine Endorhamnosidase war. In HK620TSP wird die Rhamnose zwar noch gebunden, die Spaltstelle hat sich aber eventuell inzwischen verschoben.

Für die Röntgenstrukturanalyse wurde das proteaseresistente Fragment HK620TSP Δ N (Asp¹¹⁰-Val⁷¹⁰) kloniert und kristallisiert. Das Volllängenprotein kristallisiert nicht, in Analogie zu P22TSP und Sf6TSP, vermutlich weil dies durch den flexiblen *linker* zwischen Kopfbindingdomäne und β -Helix-Domäne verhindert wird (Freiberg, 2000; Steinbacher *et al.*, 1997). Die Kristallisation von HK620TSP Δ N war jedoch nicht reproduzierbar und dauerte mehrere Monate. Mit der limitierten Anzahl von Kristallen konnten nicht genügend Bedingungen zur Schwermetallderivatisierung getestet werden. Auch die Lebensdauer einer Selenomethioninmutante war unter den gegebenen Bedingungen zu gering für die Kristallisation. Die Phasierung eines nativen Datensatzes mit molekularem Ersatz und Sf6TSP oder P22TSP als Modell war nicht möglich. Nach Abschluss der im Ergebnisteil dokumentierten Experimente erhielten wir doch noch streuende Kristalle einer Selenomethioninmutante von HK620TSP Δ N. Dabei wurde das Reinigungsprotokoll für das Protein verbessert und zuerst über hydrophobe Interaktionschromatographie und dann über Ionenaustausch mit Q-Sepharose anstelle von modifizierter Cellulose gereinigt.

Das Protein kristallisierte nun unter anderen Bedingungen, aber in der gleichen Raumgruppe (J. Müller, pers. Mitteilung). Dies deutet auf eine im Gegensatz zu P22TSP und Sf6TSP andere Oberflächenladungsstruktur bei HK620TSP hin. Gestützt wird dies auch durch die Beobachtung, dass HK620TSP weniger hoch konzentriert werden kann und dass es nativ nur mit kleiner Keimzahl aus Lösungen mit geringer Ionenstärke kristallisiert.

Lage des aktiven Zentrums beim Sf6 Tailspike

Die Lage des aktiven Zentrums in Sf6TSP wurde mit gerichteter Mutagenese und mit Kokristallisationsexperimenten mit Oligosacchariden untersucht. Dabei wurden Aminosäureaustausche von Carboxylaten zu den jeweiligen Säureamiden vorgenommen. Es konnten zwei Mutanten hergestellt werden, die nur 13 % bzw. 1.5 % der Wildtypaktivität aufweisen. Die beteiligten Säurereste befinden sich am Rand einer Grube zwischen den Untereinheiten von Sf6TSP. Dies deutet darauf hin, dass sich das aktive Zentrum nicht wie bei P22TSP auf dem Rücken einer einzelnen Untereinheit befindet, sondern zwischen zwei Monomeren. Allerdings sind die beiden ausgetauschten Säurereste vermutlich nicht an der Spaltung des Substrats beteiligt, sondern lediglich an der Bindung. Der jeweilige Austausch eines einzigen katalytischen Rests bei P22TSP setzt die Aktivität stärker herab, auf weniger als 0.01 % des Wildtyps (Baxa *et al.*, 1996). Außerdem muss ein effizient gespaltenes Oligosaccharid mindestens zwei O-Antigen-*repeats* am nicht reduzierenden Ende des katalytischen Zentrums binden (Baxa *et al.*, 2001). Nimmt man an, dass sowohl unterhalb als auch oberhalb der mutierten Reste in Sf6TSP ein O-Antigen-*repeat* positioniert ist, dann deutet dies auf die Lage des katalytischen Zentrums C-terminal der beiden mutierten Reste hin. Dort findet man auch ein stark negatives Oberflächenpotential (Abbildung 49). Neueste Mutageneseuntersuchungen an Sf6TSP haben bestätigt, dass sich hier tatsächlich das aktive Zentrum befindet (Karolin Heinle, pers. Mitteilung). Damit haben sich im Laufe der Evolution der Tailspike Proteine zwei unterschiedliche Positionen für das katalytische Zentrum entwickelt. Bindestellen zwischen den Untereinheiten findet man bei ca. 1/6 aller oligomeren Enzyme (Nooren & Thornton, 2003). Z.B. bindet in der trimeren Galaktosid-Acetyltransferase aus *E.Coli* der Cofaktor Acetyl-CoA ebenfalls in einer langen Grube zwischen zwei benachbarten, linksgängigen β -Helices (Wang *et al.*, 2002). Die Kenntnis der katalytisch aktiven Reste ermöglicht die Herstellung von inaktiven Mutanten. Damit könnten auch die Bindungskonstanten von Sf6TSP bestimmt werden. In der Michaelis-Menten Enzymkinetik wurde bei Substratkonzentrationen von bis zu 0.1 mM Dodekasaccharid keine Substratsättigung erreicht. Außerdem könnte die Bindung an längeren Oligosacchariden untersucht werden, die eher dem physiologischen Substrat von langen Polysacchariden entsprechen und höhere Affinität haben (Laederach & Reilly, 2005). Die schlechtere Substrataffinität kann dabei schon durch wenige Aminosäureaustausche entstanden sein. Bereits bei P22TSP wurden Punktmutanten gefunden, die zwar die Bindung, aber nicht die katalytische Rate beeinflussen (Baxa *et al.*, 1999).

Auch der Verzweigungsgrad der repetitiven Einheit beeinflusst offenbar die Bindungseigenschaften des Tailspike Proteins zu seinem Substrat. So erkennt und spaltet Sf6TSP die Serotypen X und Y (Chua *et al.*, 1999), sowie partiell Serotyp 5a. Die Serotypen 2a und 2b werden dagegen erkannt, aber nicht hydrolysiert (R. Morona, pers. Mitteilung).

Ausblick

Die Tailspike Proteine der Bakteriophagen P22, Sf6 und HK620 falten in ihrem nicht sequenzhomologen Teil zu einer oligomeren, rechtsgängigen, parallelen β -Helix. Dies wurde auch für HK620TSP mit der kürzlich gelösten Kristallstruktur bestätigt (J.Müller, pers. Mitteilung). Damit ist die geringe Sequenzhomologie der β -Helixdomänen nicht nur ein Zeichen für die schnelle Evolution der Bakteriophagen Genome. Im Umkehrschluss kann die geringe Sequenzhomologie sogar als Hinweis auf das Vorhandensein der parallelen β -Helix in den funktionshomologen Tailspike Proteinen angesehen werden, denn die Struktur der β -Helix toleriert Aminosäureaustausche besonders gut. Dies erschwert jedoch gleichzeitig ihre Strukturvorhersage aus der Aminosäuresequenz (Bradley *et al.*, 2001). Die Strukturen der Tailspike Proteine vergrößern somit den Datensatz, mit dem geeignete Algorithmen zur Vorhersage der parallelen β -Helix entwickelt werden könnten. Parallele β -Helices sind auch als Modelle für amyloide Strukturen verwendet worden (Wetzel, 2002). Sie sind aber sicher kein allgemeines Vorbild für den molekularen Aufbau der Fasern. Die Tailspike Proteine könnten zumindest als Modell für ein lösliches Protein mit *cross*- β -Struktur dienen, um die Faltung und Assoziation von Protofilamenten (entsprechend den monomeren β -Helices) zu Fibrillen (entsprechend nativen Trimeren) zu untersuchen. Vorversuche zeigen, dass die Kinetiken der Rückfaltung und Assemblierung von Sf6TSP den bei P22TSP gemessenen ähneln. Hiervon ausgehend könnten generelle Regeln für die Assoziation von Amyloidbausteinen formuliert werden.

Bei der hohen Mutageneserate von Phagen Genomen bleibt die Funktion der jeweiligen Genabschnitte konserviert (Casjens *et al.*, 2004). Als Selektionskriterium für die Rezeptorbindedomänen der Tailspike Proteine dürften damit zum einen die Proteinstabilität, der oligomere Zustand und die Gesamtlänge gelten. Zum anderen muss die Aktivität gegenüber dem Wirtszellrezeptor erhalten bleiben, damit erhält man auch eine Kopplung an die Mutagenesegeschwindigkeit des Wirtes. Der Vergleich von P22TSP und Sf6TSP zeigt, wie ein katalytisches Zentrum dabei im Laufe der Evolution seine Lage verändert hat. In zukünftigen Arbeiten müsste die Bindung und Aktivität der Tailspike Proteine gegenüber ihren Substraten charakterisiert und mit den schon bekannten Untersuchungen an P22TSP verglichen werden (Baxa *et al.*, 2001; Baxa *et al.*, 1996). Insbesondere zu HK620TSP fehlen hier noch Daten. Hieraus könnten generelle Prinzipien für die Evolution von Kohlenhydratrezeptoren abgeleitet werden.

6. Literaturverzeichnis

- Ackermann, H. W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch Virol* **146**, 843-857.
- Allison, G. E. & Verma, N. K. (2000). Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends in Microbiology* **8**, 17-23.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Apweiler, R., Bairoch, A. & Wu, C. H. (2004). Protein sequence databases. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 76-80.
- Bailey, S. (1994). The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50**, 760-763.
- Barbeyron, T., Michel, G., Potin, P., Henrissat, B. & Kloareg, B. (2000). Iota-Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of kappa-carrageenases. *J Biol Chem* **275**, 35499-35505.
- Basak, A. K., Gouet, P., Grimes, J., Roy, P. & Stuart, D. (1996). Crystal structure of the top domain of African horse sickness virus VP7: comparisons with bluetongue virus VP7. *J Virol* **70**, 3797-3806.
- Baxa, U. (1995). Lipopolysacchariderkennung durch das Adhäsins des Bakteriophagen P22. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Baxa, U. (1998). Lipopolysaccharid-Erkennung durch das P22 Tailspikeprotein. Doktorarbeit. Universität Regensburg.
- Baxa, U., Steinbacher, S., Weintraub, A., Huber, R. & Seckler, R. (1999). Mutations improving the folding of phage P22 tailspike protein affect its receptor binding activity. *J Mol Biol* **293**, 693-701.
- Baxa, U., Cooper, A., Weintraub, A., Pfeil, W. & Seckler, R. (2001). Enthalpic barriers to the hydrophobic binding of oligosaccharides to phage P22 tailspike protein. *Biochemistry* **40**, 5144-5150.
- Baxa, U., Steinbacher, S., Miller, S., Weintraub, A., Huber, R. & Seckler, R. (1996). Interactions of Phage P22 Tails with Their Cellular Receptor, *Salmonella* O-Antigen Polysaccharide. *Biophysical Journal* **71**, 2040-2048.
- Bayer, M. E., Takeda, K. & Uetake, H. (1980). Effects of receptor destruction by *Salmonella* bacteriophages epsilon 15 and c341. *Virology* **105**, 328-337.
- Beaman, T. W., Sugantino, M. & Roderick, S. L. (1998). Structure of the hexapeptide xenobiotic acetyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **37**, 6689-6696.
- Beamer, L. J., Carroll, S. F. & Eisenberg, D. (1997). Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science* **276**, 1861-1864.
- Bearden, J. A. & Burr, A. F. (1967). Reevaluation of X-Ray Atomic Energy Levels. *Reviews of Modern Physics* **39**, 125ff.
- Beissinger, M., Lee, S. C., Steinbacher, S., Reinemer, P., Huber, R., Yu, M. H. & Seckler, R. (1995). Mutations that stabilize folding intermediates of phage P22 tailspike protein: folding in vivo and in vitro, stability, and structural context. *J Mol Biol* **249**, 185-194.
- Benton, C. B., King, J. & Clark, P. L. (2002). Characterization of the protrimer intermediate in the folding pathway of the interdigitated beta-helix tailspike protein. *Biochemistry* **41**, 5093-5103.
- Berget, P. B. & Poteete, A. R. (1980). Structure and functions of the bacteriophage P22 tail protein. *J Virol* **34**, 234-243.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**, 235-242.
- Betts, S. & King, J. (1999). There's a right way and a wrong way: in vivo and in vitro folding, misfolding and subunit assembly of the P22 tailspike. *Structure Fold Des* **7**, R131-139.
- Bewley, M. C., Springer, K., Zhang, Y. B., Freimuth, P. & Flanagan, J. M. (1999). Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* **286**, 1579-1583.
- Bhandari, P. & Gowrishankar, J. (1997). An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J Bacteriol* **179**, 4403-4406.

- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523.
- Blake, C. & Serpell, L. (1996).** Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix. *Structure* **4**, 989-998.
- Botstein, D. & Herskowitz, I. (1974).** Properties of hybrids between Salmonella phage P22 and coliphage lambda. *Nature* **251**, 584-589.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bradley, D. E. (1967).** Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriol Rev* **31**, 230-314.
- Bradley, P., Cowen, L., Menke, M., King, J. & Berger, B. (2001).** BETAWRAP: successful prediction of parallel beta -helices from primary sequence reveals an association with many microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14819-14824.
- Bravo, J., Staunton, D., Heath, J. K. & Jones, E. Y. (1998).** Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130. *Embo J* **17**, 1665-1674.
- Brunger, A. T. (1992).** Free R-Value - a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal-Structures. *Nature* **355**, 472-475.
- Brussow, H., Canchaya, C. & Hardt, W. D. (2004).** Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 560-602.
- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J. & Huber, R. (1995).** High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **230**, 788-796.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987).** X11-Blue - a High-Efficiency Plasmid Transforming *Escherichia-Coli* Strain with Beta-Galactosidase Selection. *Biotechniques* **5**, 376ff.
- Canady, M. A., Larson, S. B., Day, J. & McPherson, A. (1996).** Crystal structure of turnip yellow mosaic virus. *Nat Struct Biol* **3**, 771-781.
- Carlin, N. I., Lindberg, A. A., Bock, K. & Bundle, D. R. (1984).** The *Shigella flexneri* O-antigenic polysaccharide chain. Nature of the biological repeating unit. *Eur J Biochem* **139**, 189-194.
- Casjens, S. (2003).** Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* **49**, 277-300.
- Casjens, S., Winn-Stapley, D. A., Gilcrease, E. B., Morona, R., Kuhlewein, C., Chua, J. E., Manning, P. A., Inwood, W. & Clark, A. J. (2004).** The chromosome of *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6: complete nucleotide sequence, genetic mosaicism, and DNA packaging. *J Mol Biol* **339**, 379-394.
- Chandrasekar, V. & Johnson, J. E. (1998).** The structure of tobacco ringspot virus: a link in the evolution of icosahedral capsids in the picornavirus superfamily. *Structure* **6**, 157-171.
- Chappell, J. D., Prota, A. E., Dermody, T. S. & Stehle, T. (2002).** Crystal structure of reovirus attachment protein sigma1 reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber. *Embo J* **21**, 1-11.
- Chen, B. & King, J. (1991).** Thermal unfolding pathway for the thermostable P22 tailspike endorhamnosidase. *Biochemistry* **30**, 6260-6269.
- Chiu, C. H., Tang, P., Chu, C., Hu, S., Bao, Q., Yu, J., Chou, Y. Y., Wang, H. S. & Lee, Y. S. (2005).** The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res* **33**, 1690-1698.
- Chua, J. E. H., Manning, P. A. & Morona, R. (1999).** The *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6 tailspike protein (TSP)/endorhamnosidase is related to the bacteriophage P22 TSP and has a motif common to exo- and endoglycanases, and C-5 epimerases. *Microbiology* **145**, 1649-1659.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M. & Barton, G. J. (2004).** The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* **20**, 426-427.
- Clark, A. J., Inwood, W., Cloutier, T. & Dhillon, T. S. (2001).** Nucleotide sequence of coliphage HK620 and the evolution of lambdaoid phages. *J Mol Biol* **311**, 657-679.
- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J. & Ashe, K. H. (2005).** Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* **8**, 79-84.
- Coffey, M. C., Strong, J. E., Forsyth, P. A. & Lee, P. W. (1998).** Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* **282**, 1332-1334.

- Czerwinski, E. W., Midoro-Horiuti, T., White, M. A., Brooks, E. G. & Goldblum, R. M. (2005). Crystal structure of Jun a 1, the major cedar pollen allergen from *Juniperus ashei*, reveals a parallel beta-helical core. *J Biol Chem* **280**, 3740-3746.
- Danner, M. & Seckler, R. (1993). Mechanism of phage P22 tailspike protein folding mutations. *Protein Sci* **2**, 1869-1881.
- Danner, M., Fuchs, A., Miller, S. & Seckler, R. (1993). Folding and assembly of phage P22 tailspike endorhamnosidase lacking the N-terminal, head-binding domain. *Eur J Biochem* **215**, 653-661.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853-859.
- DeLano, W. L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. San Carlos, CA, USA: DeLano Scientific.
- Der-Sarkissian, A., Jao, C. C., Chen, J. & Langen, R. (2003). Structural organization of alpha-synuclein fibrils studied by site-directed spin labeling. *J Biol Chem* **278**, 37530-37535.
- Dhillon, T. S., Poon, A. P., Chan, D. & Clark, A. J. (1998). General transducing phages like Salmonella phage P22 isolated using a smooth strain of *Escherichia coli* as host. *FEMS Microbiol Lett* **161**, 129-133.
- Dobbins, A. T., George, M., Jr., Basham, D. A., Ford, M. E., Houtz, J. M., Pedulla, M. L., Lawrence, J. G., Hatfull, G. F. & Hendrix, R. W. (2004). Complete genomic sequence of the virulent Salmonella bacteriophage SP6. *J Bacteriol* **186**, 1933-1944.
- Dubendorff, J. W. & Studier, F. W. (1991a). Creation of a T7 autogene. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. *J Mol Biol* **219**, 61-68.
- Dubendorff, J. W. & Studier, F. W. (1991b). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* **219**, 45-59.
- Duckworth, D. (1994). Bacteriophages. In *Encyclopedia of Virology*. Edited by R. Webster & A. Granoff. London: Academic Press.
- Durmort, C., Stehlin, C., Schoehn, G., Mitraki, A., Drouet, E., Cusack, S. & Burmeister, W. P. (2001). Structure of the fiber head of Ad3, a non-CAR-binding serotype of adenovirus. *Virology* **285**, 302-312.
- Eriksson, U. & Lindberg, A. A. (1977). Adsorption of phage P22 to *Salmonella typhimurium*. *J Gen Virol* **34**, 207-221.
- Eriksson, U., Svenson, S. B., Lonngren, J. & Lindberg, A. A. (1979). Salmonella phage glycanases: substrate specificity of the phage P22 endo-rhamnosidase. *J Gen Virol* **43**, 503-511.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617.
- Fiedler, C. (2005). Stabilität und Faltung des Det7 Tailspike Proteins. Diplomarbeit. Universität Potsdam.
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* **155**, 83-88.
- Freiberg, A. (2000). Das Tailspikeprotein des Bakteriophagen Sf6. Diplomarbeit. Universität Potsdam.
- Freiberg, A. (2004). Das „Leucine-Rich Repeat“ im Invasionsprotein Internalin B: Stabilität und Faltung eines Solenoidproteins. Doktorarbeit. Universität Potsdam.
- Freiberg, A., Morona, R., Van den Bosch, L., Jung, C., Behlke, J., Carlin, N., Seckler, R. & Baxa, U. (2003). The tailspike protein of Shigella phage Sf6. A structural homolog of Salmonella phage P22 tailspike protein without sequence similarity in the beta-helix domain. *J Biol Chem* **278**, 1542-1548.
- Friguet, B., Djavadi Ohaniance, L., King, J. & Goldberg, M. E. (1994). In vitro and ribosome-bound folding intermediates of P22 tailspike protein detected with monoclonal antibodies. *J Biol Chem* **269**, 15945-15949.
- Friguet, B., Djavadi Ohaniance, L., Haase Pettingell, C. A., King, J. & Goldberg, M. E. (1990). Properties of monoclonal antibodies selected for probing the conformation of wild type and mutant forms of the P22 tailspike endorhamnosidase. *J Biol Chem* **265**, 10347-10351.
- Fuchs, A., Seiderer, C. & Seckler, R. (1991). In vitro folding pathway of phage P22 tailspike protein. *Biochemistry* **30**, 6598-6604.
- Glusker, J. P., Lewis, M. & Rossi, M. (1994). *Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists*. New York: VCH Publishers, Inc.
- Goldenberg, D. P. & King, J. (1981). Temperature-sensitive mutants blocked in the folding or subunit of the bacteriophage P22 tail spike protein. II. Active mutant proteins matured at 30 degrees C. *J Mol Biol* **145**, 633-651.

- Goldenberg, D. P., Berget, P. B. & King, J. (1982). Maturation of the tail spike endorhamnosidase of Salmonella phage P22. *J Biol Chem* **257**, 7864-7871.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8342-8347.
- Graether, S. P., Kuiper, M. J., Gagne, S. M., Walker, V. K., Jia, Z., Sykes, B. D. & Davies, P. L. (2000). Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature* **406**, 325-328.
- Guo, J. T., Wetzel, R. & Xu, Y. (2004). Molecular modeling of the core of Abeta amyloid fibrils. *Proteins* **57**, 357-364.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Heffron, S., Moe, G. R., Sieber, V., Mengaud, J., Cossart, P., Vitali, J. & Journak, F. (1998). Sequence profile of the parallel beta helix in the pectate lyase superfamily. *J Struct Biol* **122**, 223-235.
- Herrler, G., Gross, H. J., Imhof, A., Brossmer, R., Milks, G. & Paulson, J. C. (1992). A synthetic sialic acid analogue is recognized by influenza C virus as a receptor determinant but is resistant to the receptor-destroying enzyme. *J Biol Chem* **267**, 12501-12505.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32.
- Holm, L. & Sander, C. (1996). Mapping the protein universe. *Science* **273**, 595-603.
- Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. (1990). HERA--a program to draw schematic diagrams of protein secondary structures. *Proteins* **8**, 203-212.
- Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. (1996). PROMOTIF--a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci* **5**, 212-220.
- Israel, J. V., Anderson, T. F. & Levine, M. (1967). In vitro morphogenesis of phage P22 from heads and base-plate parts. *Proc N A S* **57**, 284-291.
- Israel, V. (1978). A model for the adsorption of phage P22 to Salmonella typhimurium. *J Gen Virol* **40**, 669-673.
- Iupac (1970). IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *Biochemistry* **9**, 3475.
- Ivanova, M. I., Sawaya, M. R., Gingery, M., Attinger, A. & Eisenberg, D. (2004). An amyloid-forming segment of beta2-microglobulin suggests a molecular model for the fibril. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10584-10589.
- Jain, M., Evans, M. S., King, J. & Clark, P. L. (2005). Monoclonal antibody epitope mapping describes tailspike beta-helix folding and aggregation intermediates. *J Biol Chem* **280**, 23032-23040.
- Jann, B., Shashkov, A. S., Gupta, D. S. & Jann, K. (1992). The O18 antigens (lipopolysaccharides) of Escherichia coli. Structural characterization of the O18A, O18A1, O18B and O18B1-specific polysaccharides. *Eur J Biochem* **210**, 241-248.
- Jenkins, J. & Pickersgill, R. (2001). The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Prog Biophys Mol Biol* **77**, 111-175.
- Jenkins, J., Mayans, O. & Pickersgill, R. (1998). Structure and evolution of parallel beta-helix proteins. *J Struct Biol* **122**, 236-246.
- Jimenez, J. L., Guijarro, J. I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C. M., Sunde, M. & Saibil, H. R. (1999). Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *Embo J* **18**, 815-821.
- Jin, X., Ballicora, M. A., Preiss, J. & Geiger, J. H. (2005). Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Embo J* **24**, 694-704.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved Methods for Building Protein Models in Electron-Density Maps and the Location of Errors in These Models. *Acta Crystallographica Section A* **47**, 110-119.
- Juhala, R. J., Ford, M. E., Duda, R. L., Youlton, A., Hatfull, G. F. & Hendrix, R. W. (2000). Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdaoid bacteriophages. *J Mol Biol* **299**, 27-51.
- Jung, C. (2000). Insight into protein structure and protein-ligand recognition by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Recognition* **13**, 325-351.
- Kabsch, W. (1993). Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 795-800.

- Kabsch, W. & Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
- Kajava, A. V., Aebi, U. & Steven, A. C. (2005). The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin. *J Mol Biol* **348**, 247-252.
- Kajava, A. V., Baxa, U., Wickner, R. B. & Steven, A. C. (2004). A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7885-7890.
- Kanamaru, S., Leiman, P. G., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F. & Rossmann, M. G. (2002). Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature* **415**, 553-557.
- Kanegasaki, S. & Wright, A. (1973). Studies on the mechanism of phage adsorption: interaction between phage epsilon 15 and its cellular receptor. *Virology* **52**, 160-173.
- Kauffman, F. (1966). *The Bacteriology of Enterobacteriaceae: III. Salmonella*. Copenhagen, Denmark: Munksgaard-Copenhagen.
- Khurana, R. & Fink, A. L. (2000). Do Parallel beta-Helix Proteins Have a Unique Fourier Transform Infrared Spectrum? *J Biophys* **78**, 994 - 1000.
- Khurana, R., Ionescu-Zanetti, C., Pope, M., Li, J., Nielson, L., Ramirez-Alvarado, M., Regan, L., Fink, A. L. & Carter, S. A. (2003). A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. *Biophys J* **85**, 1135-1144.
- King, J. & Laemmli, U. K. (1971). Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol* **62**, 465-477.
- Kishimoto, A., Hasegawa, K., Suzuki, H., Taguchi, H., Namba, K. & Yoshida, M. (2004). beta-Helix is a likely core structure of yeast prion Sup35 amyloid fibers. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 739-745.
- Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B. E., Ferry, J. G. & Rees, D. C. (1996). A left-hand beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Embo J* **15**, 2323-2330.
- Kobe, B. & Kajava, A. V. (2000). When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trends Biochem Sci* **25**, 509-515.
- Koradi, R., Billeter, M. & Wuthrich, K. (1996). MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics* **14**, 51-&.
- Kostyuchenko, V. A., Navruzbekov, G. A., Kurochkina, L. P., Strelkov, S. V., Mesyanzhinov, V. V. & Rossmann, M. G. (1999). The structure of bacteriophage T4 gene product 9: the trigger for tail contraction. *Structure Fold Des* **7**, 1213-1222.
- Kreisberg, J. F., Betts, S. D., Haase-Pettingell, C. & King, J. (2002). The interdigitated beta-helix domain of the P22 tailspike protein acts as a molecular clamp in trimer stabilization. *Protein Sci* **11**, 820-830.
- Laederach, A. & Reilly, P. J. (2005). Modeling protein recognition of carbohydrates. *Proteins* **60**, 591-597.
- Langs, D. A. (1988). Three-dimensional structure at 0.86 Å of the uncomplexed form of the transmembrane ion channel peptide gramicidin A. *Science* **241**, 188-191.
- Larsson, A. M., Andersson, R., Stahlberg, J., Kenne, L. & Jones, T. A. (2003). Dextranase from *Penicillium minioluteum*: reaction course, crystal structure, and product complex. *Structure (Camb)* **11**, 1111-1121.
- Laskowski, R. A. (1995). SURFNET: a program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions. *J Mol Graph* **13**, 323-330, 307-328.
- Lazo, N. D. & Downing, D. T. (1998). Amyloid fibrils may be assembled from beta-helical protofibrils. *Biochemistry* **37**, 1731-1735.
- Lebowitz, J., Lewis, M. S. & Schuck, P. (2002). Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci* **11**, 2067-2079.
- Lentz, T. L. (1990). The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents. *J Gen Virol* **71**, 751-766.
- Lindberg, A. A. (1977). Bacterial Surface Carbohydrates and Bacteriophage Adsorption. In *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*, pp. 289 - 356. Edited by I. Sutherland. London: Academic Press.
- Lindberg, A. A., Wollin, R., Gemski, P. & Wohlhieter, J. A. (1978). Interaction between bacteriophage Sf6 and *Shigella flexneri*. *J Virol* **27**, 38-44.

- Liu, C., Eichelberger, M. C., Compans, R. W. & Air, G. M. (1995). Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol* **69**, 1099-1106.
- Luderitz, O., Staub, A. M. & Westphal, O. (1966). Immunochemistry of O and R Antigens of Salmonella and Related Enterobacteriaceae. *Bacteriological Reviews* **30**, 192ff.
- Manning, M. & Colon, W. (2004). Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. *Biochemistry* **43**, 11248-11254.
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. & Klenk, H. D. (2004). Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* **78**, 12665-12667.
- Maurides, P. A., Schwarz, J. J. & Berget, P. B. (1990). Intragenic suppression of a capsid assembly-defective P22 tailspike mutation. *Genetics* **125**, 673-681.
- Michalopoulos, I., Torrance, G. M., Gilbert, D. R. & Westhead, D. R. (2004). TOPS: an enhanced database of protein structural topology. *Nucleic Acids Res* **32 Database issue**, D251-254.
- Michel, G., Chantalat, L., Fanchon, E., Henrissat, B., Kloareg, B. & Dideberg, O. (2001). The iota-carrageenase of *Alteromonas fortis*. A beta-helix fold-containing enzyme for the degradation of a highly polyanionic polysaccharide. *J Biol Chem* **276**, 40202-40209.
- Miller, S. (1995). Deletions- und Punktmutanten des P22-Tailspike-Proteins: Klonierung, Reinigung, Kristallisation und Physikalisch-Biochemische Analyse. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Miller, S., Schuler, B. & Seckler, R. (1998a). A reversibly unfolding fragment of P22 tailspike protein with native structure: the isolated beta-helix domain. *Biochemistry* **37**, 9160-9168.
- Miller, S., Schuler, B. & Seckler, R. (1998b). Phage P22 tailspike protein: removal of head-binding domain unmasks effects of folding mutations on native-state thermal stability. *Protein Sci* **7**, 2223-2232.
- Mitraki, A., Miller, S. & van Raaij, M. J. (2002). Review: conformation and folding of novel beta-structural elements in viral fiber proteins: the triple beta-spiral and triple beta-helix. *J Struct Biol* **137**, 236-247.
- Mitraki, A., Danner, M., King, J. & Seckler, R. (1993). Temperature-sensitive mutations and second-site suppressor substitutions affect folding of the P22 tailspike protein in vitro. *J Biol Chem* **268**, 20071-20075.
- Mmolawa, P. T., Schmiegler, H., Tucker, C. P. & Heuzenroeder, M. W. (2003). Genomic structure of the Salmonella enterica serovar Typhimurium DT 64 bacteriophage ST64T: Evidence for modular genetic architecture. *Journal of Bacteriology* **185**, 3473-3475.
- Modrow, S. & Falke, D. (1997). *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* **12**, 88-118.
- Mühlenhoff, M., Stummeyer, K., Grove, M., Sauerborn, M. & Gerardy-Schahn, R. (2003). Proteolytic processing and oligomerization of bacteriophage-derived endosialidases. *J Biol Chem* **278**, 12634-12644.
- Müller, J. J. & Heinemann, U. (2005). Use of anomalous scattering for solving the phase problem in protein crystallography. In *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics*. Edited by H. Oschkinat & P. Schmieler. Heidelberg: Springer, in the press.
- Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. O., Riek, C., Grothe, R. & Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**, 773-778.
- Nooren, I. M. & Thornton, J. M. (2003). Diversity of protein-protein interactions. *Embo J* **22**, 3486-3492.
- Oda, Y., Saeki, K., Takahashi, Y., Maeda, T., Naitow, H., Tsukihara, T. & Fukuyama, K. (2000). Crystal structure of tobacco necrosis virus at 2.25 Å resolution. *J Mol Biol* **300**, 153-169.
- Orengo, C. A., Michie, A. D., Jones, S., Jones, D. T., Swindells, M. B. & Thornton, J. M. (1997). CATH—a hierarchical classification of protein domain structures. *Structure* **5**, 1093-1108.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Macromolecular Crystallography, Pt A*, pp. 307-326.
- Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol* **131**, 266-280.
- Pace, C. N. & Schmid, F. X. (1997). How to determine the molar absorption coefficient of a protein. In *Protein Structure - A practical approach 2nd edition*, pp. 253-259. Edited by T. E. Creighton. New York, Oxford: University Press.

- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411-2423.
- Papanikolopoulou, K., Forge, V., Goeltz, P. & Mitraki, A. (2004a). Formation of highly stable chimeric trimers by fusion of an adenovirus fiber shaft fragment with the foldon domain of bacteriophage t4 fibrin. *J Biol Chem* **279**, 8991-8998.
- Papanikolopoulou, K., Teixeira, S., Belrhali, H., Forsyth, V. T., Mitraki, A. & van Raaij, M. J. (2004b). Adenovirus fibre shaft sequences fold into the native triple beta-spiral fold when N-terminally fused to the bacteriophage T4 fibrin foldon trimerisation motif. *J Mol Biol* **342**, 219-227.
- Pedulla, M. L., Ford, M. E., Karthikeyan, T., Houtz, J. M., Hendrix, R. W., Hatfull, G. F., Poteete, A. R., Gilcrease, E. B., Winn-Stapley, D. A. & Casjens, S. R. (2003). Corrected sequence of the bacteriophage P22 genome. *Journal of Bacteriology* **185**, 1475-1477.
- Pelton, J. T. & McLean, L. R. (2000). Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical Biochemistry* **277**, 167-176.
- Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Structural Biology* **6**, 458-463.
- Perutz, M. F., Finch, J. T., Berriman, J. & Lesk, A. (2002). Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5591-5595.
- Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F. & Tycko, R. (2002). A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16742-16747.
- Pluschke, G., Moll, A., Kusecek, B. & Achtman, M. (1986). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and monoclonal antibodies as tools for the subgrouping of *Escherichia coli* lipopolysaccharide O18 and O23 antigens. *Infect Immun* **51**, 286-293.
- Puchtler, H. & Sweat, F. (1965). Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J Histochem Cytochem* **13**, 693-694.
- Raetz, C. R. & Roderick, S. L. (1995). A left-handed parallel beta helix in the structure of UDP-N-acetylglucosamine acyl-transferase. *Science* **270**, 997-1000.
- Reske, K., Wallenfels, B. & Jann, K. (1973). Enzymatic degradation of O-antigenic lipopolysaccharides by coliphage $\Omega 8$. *Eur J Biochem* **36**, 167-171.
- Robinson, A. S. & King, J. (1997). Disulphide-bonded intermediate on the folding and assembly pathway of a non-disulphide bonded protein [see comments]. *Nat Struct Biol* **4**, 450-455.
- Rohwer, F. & Edwards, R. (2002). The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *Journal of Bacteriology* **184**, 4529-4535.
- Sambashivan, S., Liu, Y., Sawaya, M. R., Gingery, M. & Eisenberg, D. (2005). Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure. *Nature* **437**, 266-269.
- Schlegel, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Schmid, F. X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure - A practical approach 2nd editon*, pp. 261-297. Edited by T. E. Creighton. New York, Oxford: University Press.
- Schubert, W. D., Gobel, G., Diepholz, M., Darji, A., Kloer, D., Hain, T., Chakraborty, T., Wehland, J., Domann, E. & Heinz, D. W. (2001). Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *J Mol Biol* **312**, 783-794.
- Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* **78**, 1606-1619.
- Schuler, B. & Seckler, R. (1998). P22 tailspike folding mutants revisited: effects on the thermodynamic stability of the isolated beta-helix domain. *J Mol Biol* **281**, 227-234.
- Schwarz, J. J. & Berget, P. B. (1989). Characterization of bacteriophage P22 tailspike mutant proteins with altered endorhamnosidase and capsid assembly activities. *J Biol Chem* **264**, 20112-20119.
- Seckler, R. (1998). Folding and function of repetitive structure in the homotrimeric phage P22 tailspike protein. *J Struct Biol* **122**, 216-222.

- Seckler, R., Fuchs, A., King, J. & Jaenicke, R. (1989). Reconstitution of the thermostable trimeric phage P22 tailspike protein from denatured chains in vitro. *J Biol Chem* **264**, 11750-11753.
- Serpell, L. C., Sunde, M., Benson, M. D., Tennent, G. A., Pepys, M. B. & Fraser, P. E. (2000). The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J Mol Biol* **300**, 1033-1039.
- Seul, A. (2003). Oligomerisierung der Kopfbindungsdomäne des Tailspikeproteins des Bakteriophagen P22. Diplomarbeit. Universität Potsdam.
- Sieber, V., Jurnak, F. & Moe, G. R. (1995). Circular dichroism of the parallel beta helical proteins pectate lyase C and E. *Proteins* **23**, 32-37.
- Sierk, M. L. & Kleywegt, G. J. (2004). Deja vu all over again: finding and analyzing protein structure similarities. *Structure (Camb)* **12**, 2103-2111.
- Smits, S. L., Gerwig, G. J., van Vliet, A. L., Lissenberg, A., Briza, P., Kamerling, J. P., Vlasak, R. & de Groot, R. J. (2005). Nidovirus sialate-O-acetyltransferases: evolution and substrate specificity of coronaviral and toroviral receptor-destroying enzymes. *J Biol Chem* **280**, 6933-6941.
- Speir, J. A., Munshi, S., Wang, G., Baker, T. S. & Johnson, J. E. (1995). Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure* **3**, 63-78.
- Stahl, B., Steup, M., Karas, M. & Hillenkamp, F. (1991). Analysis of Neutral Oligosaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem* **63**, 1463 - 1466.
- Steinbacher, S., Seckler, R., Miller, S., Steipe, B., Huber, R. & Reinemer, P. (1994). Crystal structure of P22 tailspike protein: interdigitated subunits in a thermostable trimer. *Science* **265**, 383-386.
- Steinbacher, S., Baxa, U., Miller, S., Weintraub, A., Seckler, R. & Huber, R. (1996). Crystal structure of phage P22 tailspike protein complexed with *Salmonella* sp. O-antigen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10584-10588.
- Steinbacher, S., Miller, S., Baxa, U., Budisa, N., Weintraub, A., Seckler, R. & Huber, R. (1997). Phage P22 tailspike protein: crystal structure of the head-binding domain at 2.3 Å, fully refined structure of the endorhamnosidase at 1.56 Å resolution, and the molecular basis of O-antigen recognition and cleavage. *J Mol Biol* **267**, 865-880.
- Strasser, P., Unger, U., Strobl, B., Vilas, U. & Vlasak, R. (2004). Recombinant viral sialate-O-acetyltransferases. *Glycoconj J* **20**, 551-561.
- Stummeyer, K., Dickmanns, A., Muhlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R. & Ficner, R. (2005). Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 90-96.
- Sunde, M. & Blake, C. C. (1998). From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Q Rev Biophys* **31**, 1-39.
- Suttle, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature* **437**, 356-361.
- Svenson, S. B., Lonngren, J., Carlin, N. & Lindberg, A. A. (1979). Salmonella bacteriophage glycanases: endorhamnosidases of *Salmonella typhimurium* bacteriophages. *J Virol* **32**, 583-592.
- Szabó, Z. G. (1969). Kinetic Characterization of Complex Reaction Systems. In *Comprehensive Chemical Kinetics*, pp. 1-80. Edited by C. H. Bamford & C. F. H. Tipper. Amsterdam: Elsevier.
- Takeda, K. & Uetake, H. (1973). In vitro interaction between phage and receptor lipopolysaccharide: a novel glycosidase associated with *Salmonella* phage epsilon15. *Virology* **52**, 148-159.
- Tanaka, K., Nishimori, K., Makino, S. C., Nishimori, T., Kanno, T., Ishihara, R., Sameshima, T., Akiba, M., Nakazawa, M., Yokomizo, Y. & Uchida, I. (2004). Molecular characterization of a prophage of *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1807-1812.
- Tang, L., Marion, W. R., Cingolani, G., Prevelige, P. E. & Johnson, J. E. (2005). Three-dimensional structure of the bacteriophage P22 tail machine. *Embo J* **24**, 2087-2095.
- Tang, X., Nakata, Y., Li, H., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T. & Yokoyama, K. (1994). The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucl. Acids Res.* **22**, 2857-2858.
- Tao, Y., Strelkov, S. V., Mesyanzhinov, V. V. & Rossmann, M. G. (1997). Structure of bacteriophage T4 fibritin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain. *Structure* **5**, 789-798.
- Terwilliger, T. C. (2000). Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56 (Pt 8)**, 965-972.

- Terwilliger, T. C. & Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55** (Pt 4), 849-861.
- Tormo, J., Lamed, R., Chirino, A. J., Morag, E., Bayer, E. A., Shoham, Y. & Steitz, T. A. (1996). Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *Embo J* **15**, 5739-5751.
- True, H. L. & Lindquist, S. L. (2000). A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* **407**, 477-483.
- Vaara, M. (1992). Eight bacterial proteins, including UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase (LpxA) and three other transferases of *Escherichia coli*, consist of a six-residue periodicity theme. *FEMS Microbiol Lett* **76**, 249-254.
- van der Willk, F., Dulleman, A. M., Verbeek, M. & van den Heuvel, J. F. (1999). Isolation and characterization of APSE-1, a bacteriophage infecting the secondary endosymbiont of *Acyrtosiphon pisum*. *Virology* **262**, 104-113.
- van Raaij, M. J., Mitraki, A., Lavigne, G. & Cusack, S. (1999). A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature* **401**, 935-938.
- van Raaij, M. J., Schoehn, G., Burda, M. R. & Miller, S. (2001). Crystal structure of a heat and protease-stable part of the bacteriophage T4 short tail fibre. *J Mol Biol* **314**, 1137-1146.
- Wallace, B. A. & Ravikumar, K. (1988). The gramicidin pore: crystal structure of a cesium complex. *Science* **241**, 182-187.
- Wallace, B. A. & Janes, R. W. (2001). Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 567-571.
- Walter, M. (2002). Die parallele beta-Helix der Pektatlyase aus *Bacillus Subtilis*: Stabilität, Faltungsmechanismus und Faltungsmutanten. Doktorarbeit. Universität Potsdam.
- Wang, X. G., Olsen, L. R. & Roderick, S. L. (2002). Structure of the lac operon galactoside acetyltransferase. *Structure (Camb)* **10**, 581-588.
- Weigele, P. R., Scanlon, E. & King, J. (2003). Homotrimeric, beta-stranded viral adhesins and tail proteins. *J Bacteriol* **185**, 4022-4030.
- Weintraub, A., Lindberg, A. A., Lipniunas, P. & Nilsson, B. (1988). Heterogeneity in Oligosaccharides from the O-Polysaccharide Chain of the Lipopolysaccharide from *Salmonella-Typhi* 253ty Determined by Fast Atom Bombardment Mass-Spectrometry. *Glycoconjugate Journal* **5**, 207-213.
- Weis, W., Brown, J. H., Cusack, S., Paulson, J. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1988). Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**, 426-431.
- Westphal, O. & Jann, K. (1965). Bacterial Lipopolysaccharides. *Meth in Carbohydr Chem*, 83 - 91.
- Westphal, O., Luderitz, O. & Bister, F. (1952). Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Naturforschung* **7 B**, 148 - 155.
- Wetzel, R. (2002). Ideas of order for amyloid fibril structure. *Structure (Camb)* **10**, 1031-1036.
- Wickner, R. B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **264**, 566-569.
- Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A. & Prusiner, S. B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3563-3568.
- Yoder, M. D., Keen, N. T. & Journak, F. (1993a). New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* **260**, 1503-1507.
- Yoder, M. D., Lietzke, S. E. & Journak, F. (1993b). Unusual structural features in the parallel beta-helix in pectate lyases. *Structure* **1**, 241-251.
- Zinder, N. D. & Lederberg, J. (1952a). Genetic Exchange in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology* **64**, 679-699.
- Zinder, N. D. & Lederberg, J. (1952b). Gene Transfer in *Salmonella*. *Genetics* **37**, 639-639.

Sequenzalignment von Tailspike Proteinen mit CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)
 [Thompson, 1994 #215].

```
P22TSP      1 - MTDIITANVYVSNRPRI FTESRSFKAVANGKI YIGQIDTDFVNPANQIPVYIENEDGSHVQITQPLIINAAG 71
S_Chol_hyp  1 - MSDIITANVYVSNRPRI FTESRSFKAVADGKI YIGKIDTDFVNPANQIPVYIENEDGSHVQIAQPLIINSAG 71
Sf6TSP      1 - MTDIITNVYIGMPSQLFTMARSFKAVANGKI YIGKIDTDFVNPENQIQVYVENEDGSHVPASQPIVINAAG 71
HK620TSP    1 - MTDIINANVYVSMPSQLFTMARSFKAVANGKI YIGKIDTDFVNPENRIQVYVENEDGSHVPVSPPIINAAG 72
APSE-1TSP   1 - MSKIIPNIIVVSMPTQLFTLRKFKQACSNNGKI YIGKSNTPITPTNQIQVYIENEDGSTVPAQPIMINHAG 71
```

```
P22TSP      72 KIVYNGQLVKIVTVQGHSMAYDANGSQVDYIANVLKYDPDQ-YSIEADKKFKYSVKLSDYPTLQDAASAAY 142
S_Chol_hyp  72 KIVYNGQLVKIVTVQGHSMAYDAYGSQVDYIANVLKYDPDQFRQLAEPDGSKKVGYK-DSNVYDTLNKLE 142
Sf6TSP      72 YPVYNGQIVKIVTVQGHSMAYDAYGSQQFYFNVLKYDPDQ-FGPDLEQLAQSGKYSQDNTKGDAMIGVK 142
HK620TSP    73 YPVYNGQIAKIVTVQGHSMAYDAYGAQQFYFNVLKYDPDQFRAIIESPEGAGHVGYQYRRNTGSTMRMVS 144
APSE-1TSP   72 FPVYNGQIAKIVTVESHSMAVYDSDGAQQFYFADILKYGFN--RFKEQAAQYIAYIEKLGKTTTQTGDSTT 141
```

```
P22TSP      143 DGLLIDRDYNYFYGGETVDFGGKVLTI ECKAKFI GDGNLI FTKLGKGSRIAGVFMESTTTPWWIKPWTDNQQW 214
S_Chol_hyp  143 LKFKSFQEMRRDDNSNEIGDYALLTGMWTEHQGYGAGVFCQVDTGLTDDGGTIAVGSTYAWKRI TGPDATE 214
Sf6TSP      143 QPLPKAVLRTQHDKNKEAISI LDFGVIDDGVTDNYYA IQNAIDAVASLPSSGELFIPASNQAVGYIVGSTLL 214
HK620TSP    145 DVLDERVSLWDFHCDPSGNVI QPGPNVDSRQYLQAAIDYVSSNGGTTITIPAGYTWYLGSYGVGGIAGHSGI 216
APSE-1TSP   142 DVMSQKACTDTFAEK-----NSKEPLKAGRLNLESSNGDTIFNLG-----GTDGSAGSEFA 192
```

```
P22TSP      215 LTDAAAVVATLKQSKTDGYQPTVSDYVYKFPGETLLPPNAKQGN--ITSTLEIRECIGVEVHRASGLMAGFL 284
S_Chol_hyp  215 FGVVPNAGSAFDNKAYILAAAATGALIFPAGDIYTKFFLTLDYIVRGNSTNLYEINDSEATDFIVHCSRNE 286
Sf6TSP      215 IPGGVNI RGVGKASQLRAKSGLTGSLVLRYSYDSDTIGRYLRNIRVTGNNTCNGIDTNI TAEDSVIRQVYGVW 286
HK620TSP    217 IQLRSNVNLIIEGRHLSPPFDLKPQVVFVGFNDGDPASSGNLENCHI YGHGVVDFGGYEFGASSQLRNGVA 288
APSE-1TSP   193 YVKNSKRQIYDTATQTLLFPQK-----NGTL 220
```

```
P22TSP      285 FRGCHFCMKMVDANNPSSGGKDGII TFENLSGDWIKGNYVIGGRTSYGVSVAQFLRNNGGFERDGGVIGFTSY 356
S_Chol_hyp  287 QWDGRIDGISWEGVNYVYVDGHRPFHTYFTTNGNMRDCRFHGGIGSWFDGVSINWIFDSCEFSGSLGGENLLN 358
Sf6TSP      287 FDNVMVNEVETAYLMQF--LWHSKFIACQAGTCRVGLHLFGQCVSVSVSSCHFSRGNYSADESFGIRIQPQT 356
HK620TSP    289 FGRSYNCSVTGIFTQNGDVTWAI TLGWNG--YGSNICYVRKCRFINLVNSSVNADHSTVYVNCPSYGVESCYF 358
APSE-1TSP   221 AVEEDTYTKTEVDAKINSVKWTTNKLENG--WMK----- 252
```

```
P22TSP      357 RAGESGVKTWQGTVGSSTSRNYN-----LQFRDSVVIPVWDFDLGADTDMNPELDRPGDYPITQY 418
S_Chol_hyp  359 TPKVDPQGTIGTWIFHKCFISR----- 381
Sf6TSP      357 YAWSSEAVRSEAI L DSETMCI G-----FKNAVYVH 387
HK620TSP    359 SMSSSFARNIACSVELHQHDTFYRGSTVNGYCRGAYVVMHAAEAAGAGSYAYNMQVENNIAVYIGQFVILGS 430
APSE-1TSP   ----- 320
```

```
P22TSP      419 PLHLQLPLNLHIDNLLVRGALGVG-----FGMDGKGMVYSNITVEDCAGSGAYLLTHESVFTNIAIID 480
S_Chol_hyp  382 -----SAGVGARTIGLPSVWFRDCIYYNRRDGLLHY 413
Sf6TSP      388 DCLDLHMEQLDLDYCGSTGVVIEIEN-----VNGGFSFNSWI AADADGTEQFTGIFYRTPTSQSHK 448
HK620TSP    431 DVTATVSGHLNDVIVSGNIVSIGERAAFSAPFGAFIDIGPDNSGASNVQDIQRVLTGNSFYAPANITDSAA 502
APSE-1TSP   253 -----DPNTGIIIQWGSYKTDRSRKLFP 276
```

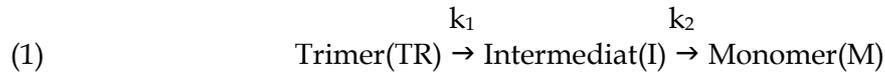
```
P22TSP      481 TNTKDFQANQIYISG--ACRVNGLRLIGIRSDGQGLTIDAPNSTVSGITGMVDPsrINVANLAE EGLNIR 550
S_Chol_hyp  414 KDEDAYPNVEFGVQKVTGCDISNDSSGVIMRDVYVPDINSNMVSSGRVLNQPgvvlIRCNDINVVENSYYF 485
Sf6TSP      449 IVSGVHINTANKNTAANNQSI AIEQSAIFVFSVSGCTLTGDEWAVNIVDINECVSFDKCI FNKPLRYLRSGGV 520
HK620TSP    503 ITLRANLNGCTFIANNFDCRYMYYNAPGTTSPVQNLWDKSNVIGGTHANQRAGQNLFDMAFASVVNSTIE 574
APSE-1TSP   277 MAFPNTLAGMGLANFNYYDDTLSEMYAPNIMSADKVGFKMRQSLVTDGYKD----- 326
```

```
P22TSP      551 ANSFGYDSAAIKLRIHKLSKTLDSGALYSHINGGAGSGSAYTQLTAISGSTPDAVSLKVNHKDCRGAEIPFV 622
S_Chol_hyp  486 NGTHG-----ISVEVCNFGTISNNNCNDNKNRGISIQSDAGISSKLTVSGNTCCGTPLGSL 541
Sf6TSP      521 SVTDCYLAG-----ITEVQKPEGRYNTYRGCSGVPSVNGIINVPVAVGATSGSAAIPNPGNLTyr 581
HK620TSP    575 VQLSCEDLSMFSCILFPASCQLSYSKI TVDSAWTKSMSNTAVFEFNQQAGANVYVSPATVNLTSYNTQGAV 646
APSE-1TSP   ----- 320
```

```
P22TSP      623 PDIASDDFIKDSSCFLPYWENNSTSLKALVKKPNEGELVRLTLATL----- 667
S_Chol_hyp  542 PTAQEEGIIIEGERIVSYGNVCTGNASSQYVNSASNKQEGMNIIS----- 586
Sf6TSP      582 RSLFGDPASSGDKVSVSGVTINVTSPVGVVALPSMVEYLA----- 623
HK620TSP    647 PFFSTDTNYAWWTSAYSLSINENLDFSPPATYTNKANGQLVGVGYNEIGGVRSVSVRLMLQRQV 710
APSE-1TSP   327 ---SPLTDMRWI AIGW----- 339
```

Kinetiken der thermischen Denaturierung in Gegenwart von SDS – Lösungen der Differentialgleichungen für das Programm SCIENTIST

Für ein Modell konsekutiver Reaktionen 1. Ordnung

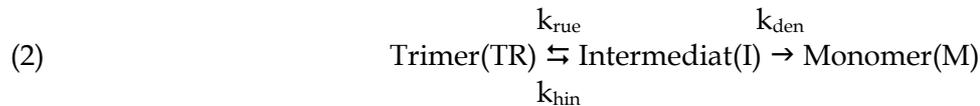


verwendet man die analytische Lösung des Differentialgleichungssystems:

$$dTR/dT = -k_1 \cdot TR, \quad dI/dT = k_1 \cdot TR - k_2 \cdot I, \quad dM/dT = k_2 \cdot I$$

```
//Modell im Programm Scientist
Unabhängige Variable: T (Zeit)
Abhängige Variablen: TR, I, M (Trimer, Intermediat, Monomer)
Parameter: K1, K2
//Konstanten
A0=100 (Ausgangskonzentration an Trimer betrug 100 %)
// Analytische Lösungen der Differentialgleichungen
TR = A0*exp(-K1*T)
I = (A0*K1/(K2-K1))*(exp(-K1*T)-exp(-K2*T))
M = A0*(1+(1/(K1-K2))*((K2*exp(-K1*T))-(K1*exp(-K2*T))))
```

Für ein Modell konsekutiver Reaktionen 1. Ordnung mit einem reversiblen Schritt



verwendete man die analytische Lösung des Differentialgleichungssystems:

$$dTR/dT = -k_{\text{hin}} \cdot TR + k_{\text{rue}} \cdot I, \quad dI/dT = k_{\text{hin}} \cdot TR - (k_{\text{rue}} + k_{\text{den}}) \cdot I, \quad dM/dT = k_{\text{den}} \cdot I$$

```
//Modell im Programm Scientist
Unabhängige Variable: T (Zeit)
Abhängige Variablen: TR, I, M (Trimer, Intermediat, Monomer)
Parameter: khin, krue, kden
//Konstanten
A0=100 (Ausgangskonzentration an Trimer betrug 100 %)
//Substituierte Variablen
B = kden+khin+krue
A = sqrt(-4*kden*khin+B^2)
C = (kden-khin)^2
D = 2*(kden+khin)*krue
E = krue^2
F = C+D+E+(exp(A*T)*(C+D+E))+((-1+exp(A*t))*(kden-khin+krue)*A)
G = 2*(C+D+E)
// Analytische Lösungen der Differentialgleichungen
TR = (A0*exp(-0.5*(B+A)*T)*F)/G
I = (A0*exp(-0.5*(B+A)*T)*(-1+exp(A*T))*khin)/A
M = 0.5*A0*(2+(exp(-0.5*(B+A)*T)*(B-(exp(A*T)*B)-((1+exp(A*T))*A)))/A)
```

Fragmente nach ESI-MS-TOF von Oligosacchariden von *E.Coli H*, Mutterion m/z 1079.3.

Fragmention / m/z	Differenz zum Mutterion	Zusammensetzung des Fragmentions	Isotopenmarkierbar? ^a
185.1	894.4	Hexose (-18) + Na ⁺	nein
226.1	853.4	N-acetylhexosamin (-18) + Na ⁺	nein
244.1	835.4	N-acetylhexosamin + Na ⁺	nein
331.1	748.4	Hexose, Deoxyhexose (-18) + Na ⁺	nein
347.1	732.4	Hexose, Deoxyhexose + Na ⁺	nein
388.1	691.3	Hexose, N-acetylhexosamin (-18) + Na ⁺	-
406.1	673.3	Hexose, N-acetylhexosamin + Na ⁺	-
493.1	586.3	2 Hexosen, Deoxyhexose (-18) + Na ⁺	-
511.2	568.3	2 Hexosen, Deoxyhexose + Na ⁺	-
550.2	529.3	2 Hexosen, N-acetylhexosamin (-18) + Na ⁺	-
568.2	511.3	2 Hexosen, N-acetylhexosamin + Na ⁺	-
609.3	470.2	1 Hexose, 2 N-acetylhexosamin + Na ⁺	ja
696.2	383.2	2 Hexosen, Deoxyhexose, N-acetylhexosamin (-18) + Na ⁺	-
714.2	365.2	2 Hexosen, Deoxyhexose, N-acetylhexosamin + Na ⁺	-
771.2	308.2	2 Hexosen, 2 N-acetylhexosamin + Na ⁺	ja
876.4	203.1	3 Hexosen, Deoxyhexose, N-acetylhexosamin + Na ⁺	ja
917.4	162.1	2 Hexosen, Deoxyhexose, 2 N-acetylhexosamin + Na ⁺	ja
933.4	146.1	3 Hexosen, 2 N-acetylhexosamin + Na ⁺	ja

^a nur für detektierbare Peaks angegeben.

Fragmente nach ESI-MS-TOF von Oligosacchariden von *E.Coli H*, Mutterion m/z 911.4.

Fragmention / m/z	Differenz zum Mutterion	Zusammensetzung des Fragmentions	Isotopenmarkierbar? ^a
204.1	707.3	N-acetylhexosamin (-18)+ H ⁺	-
222.1	689.3	N-acetylhexosamin + H ⁺	ja
325.2	586.2	2 Hexosen (-18) + H ⁺	-
366.2	545.2	1 Hexose, 1 N-acetylhexosamin (-18)+ H ⁺	-
384.2	527.2	1 Hexose, 1 N-acetylhexosamin + H ⁺	ja
425.2	486.2	2 N-acetylhexosamin + H ⁺	-
528.2	382.2	2 Hexosen, 1 N-acetylhexosamin (-18)+ H ⁺	-
546.3	365.1	2 Hexosen, 1 N-acetylhexosamin + H ⁺	ja
569.3	342.1	1 Hexose, 2 N-acetylhexosamin (-18)+ H ⁺	-
587.3	324.1	1 Hexose, 2 N-acetylhexosamin + H ⁺	ja
690.3	221.1	3 Hexosen, 1 N-acetylhexosamin (-18)+ H ⁺	-
708.3	203.1	3 Hexosen, 1 N-acetylhexosamin + H ⁺	ja
731.4	180.0	2 Hexosen, 2 N-acetylhexosamine (-18)+ H ⁺	-
749.4	162.0	2 Hexosen, 2 N-acetylhexosamine + H ⁺	ja
893.4	18.0	3 Hexosen, 2 N-acetylhexosamine (-18)+ H ⁺	Ja

^a nur für detektierbare Peaks angegeben.

Danksagung

Ohne Unterstützung, Hilfe und Anteilnahme von vielen Seiten wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Vor allem bei Robert Seckler bedanke ich mich für das Vertrauen, das er schon bei meinem Eintritt in die Arbeitsgruppe in mich gesetzt hat. Er hat mir immer große Freiheit beim Experimentieren gelassen. Während meiner Doktorarbeit durfte ich an internationalen Konferenzen teilnehmen, auch an meiner bisher schönsten in Helsinki, wo ich die Welt der Phagenforscher kennen gelernt habe. Dass ich nach zwei Familienphasen nach den Geburten meiner Kinder immer problemlos ins Labor zurückkehren konnte, verdanke ich seiner vorbildlichen und selbstverständlichen Unterstützung.

Bei Udo Heinemann vom Max-Delbrück-Zentrum (MDC) in Berlin-Buch möchte mich für die freundliche Aufnahme in sein Labor und seine Arbeitsgruppe bedanken, und dass ich die Möglichkeit hatte, selbst kristallographisch zu arbeiten.

Unermüdliche Unterstützung habe ich während dieser Arbeit am MDC von Jürgen Müller erfahren, der mir mit großer Geduld und viel Zeit geholfen hat, es in der Kristallographie vom totalen Anfänger zumindest zum gebildeten Laien zu bringen. Er hat die Phasen von sämtlichen Datensätzen berechnet, ohne die ein Strukturmodellbau nicht möglich gewesen wäre und tagelang Zwillingskristalle mit mir geröntgt.

Christiane Jung danke ich für die Messung der FT-IR-Spektren am MDC, Albrecht Otto für die N-terminalen Sequenzierungen.

An den Max-Planck-Instituten in Golm danke ich Markus Pauli (Molekulare Pflanzenphysiologie), der die Verknüpfungsanalyse und Antje Völkel (Kolloid- und Grenzflächenforschung), die die Ultrazentrifugation durchgeführt hat.

Ich bedanke mich bei Sophie Häbel für die Betreuung bei den massenspektrometrischen Experimenten und für viele Diskussionen und die Hilfe bei der Strukturaufklärung des O-Antigens.

Hervorragende technische Unterstützung habe ich von Mandy Schietke, Jana Kramer und besonders durch die Experimente von Anja Schneider erhalten. Annette Feske hat mich in Buch in die Geheimnisse der Proteinkristallisation eingeführt.

Aufgeheitert wird der Laboralltag durch die Kollegen. Ich bedanke mich bei allen für so manche Kaffeerunde und besonders bei Ben für die Lösung von Netzwerkproblemen, bei Anait für die Messung der Michaelis-Menten-Konstanten, bei Karolin für die Berechnung der Potentiale in PyMOL und bei Andreas für die Lösung der Differentialgleichungen mit Mathematica.

Den Start als echte Biochemikerin hat mir besonders Ulrich Baxa erleichtert. Er hat mich während seiner Zeit in Potsdam hervorragend betreut und mich mit seiner Begeisterung in fachlichen Diskussionen angesteckt. Er hat auch diese Arbeit sehr sorgfältig und kritisch korrigiert.

Für den Laborklatsch und -tratsch, rasende Radfahrten zum Bahnhof, tausend Leerzeichen in dieser Arbeit und das Abkleben meiner Wohnung sowie vor allem für pragmatische Tipps für den Laboralltag und das pünktliche „Essen!“ bedanke ich mich bei Monika Walter.

Schließlich bedanke ich mich bei Micha, Charlotte Rosine und Karl Seraphim, die mehr oder weniger geduldig darauf gewartet haben, dass diese Arbeit endlich fertig wird.