
**Strukturelle und funktionelle Untersuchung von
Porinen der äußeren Membran pathogener
Bakterien**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

eingereicht bei der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von
Christof Kattner

Gutachter:

1. Prof. Dr. Milton T. Stubbs
2. Dr. Ulrich Zachariae
3. Prof. Dr. Jochen Balbach

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18. November 2015

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau und Funktion bakterieller Zellmembranen.....	1
1.2 Klassifizierung von Proteinen der bakteriellen äußeren Membran.....	2
1.3 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften ausgewählter Membranporine.....	6
1.3.1 PorB aus <i>Neisseria meningitidis</i>	8
1.3.1.1 Das Pathogen <i>Neisseria meningitidis</i>	8
1.3.1.2 Transportfunktion und pathogener Einfluss von PorB	9
1.3.1.3 Struktureller Aufbau von PorB _{W135}	11
1.3.1.4 Einfluss vom PorB im bakteriellen Resistenzmechanismus.....	13
1.3.2 OmpP2 aus <i>Haemophilus influenzae</i>	14
1.3.3 FomA aus <i>Fusobacterium nukleatum</i>	16
1.4 Die Rolle der <i>Neisseria</i> -Porine in der humoralen Immunantwort.....	18
1.5 Zielstellung der Arbeit	22
2 Materialien und Methoden.....	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Technische Geräte.....	23
2.1.2 Chemikalien	24
2.1.3 Standards, Enzyme und Kits	24
2.1.4 Oligonukleotide.....	24
2.1.5 Nährmedien.....	25
2.1.6 Stämme und Plasmide.....	25
2.2 Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.2.2 Ligation.....	28
2.2.3 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen.....	29
2.2.3.1 Kompetente <i>Escherichia coli</i>	29
2.2.3.2 Kompetente <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.2.3.3 Kompetente <i>Pichia pastoris</i>	30
2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	30

2.2.5 Sequenzierung von DNA	31
2.2.6 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten.....	31
2.3 Proteinchemische Methoden.....	31
2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.3.3 Rekombinante Proteinexpression und Reinigung bakterieller Porine	33
2.3.4 Rekombinante Proteinexpression und Reinigung Toll- <i>like</i> Rezeptor 2.....	35
2.3.4.1 Expression von sTLR2 in <i>Pichia pastoris</i> und Reinigung.....	36
2.3.4.2 Expression von sTLR2 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Reinigung....	37
2.3.4.3 Expression von sTLR2 in der HEK293-Zelllinie	39
2.3.5 Proteinexpression in Minimalmedium.....	39
2.3.6 Western-Blot.....	40
2.3.7 Massenspektrometrie	41
2.3.8 Circular dichroismus (CD).....	41
2.3.9 Fluoreszenzspektroskopie	42
2.4 Ligandenbindungsexperimente	43
2.4.1 Größenausschlusschromatographie.....	43
2.4.2 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	43
2.4.3 <i>pull-down</i> -Assay	44
2.5 Rekonstitution von Porinen in künstliche Membransysteme.....	45
2.5.1 Herstellung von Proteoliposomen.....	45
2.5.2 Liposomenschwellungsanalyse.....	46
2.6 Röntgenkristallstrukturanalyse.....	47
2.6.1 Kristallisation von Membranproteinen	47
2.6.2 Datensammlung und Datenprozessierung.....	49
2.6.3 Strukturlösung, Verfeinerung und Strukturdarstellung.....	49
3 Ergebnisse.....	50
3.1 Expression, Renaturierung und Reinigung bakterieller Porine.....	50
3.1.1 Optimierung der Porinstabilität.....	51
3.1.2 Ein-Schritt Reinigung durch SEC-Gelfiltration.....	52
3.1.3 Analyse der Sekundärstruktur nach Renaturierung	56
3.2 PorB _{W135} aus <i>Neisseria meningitidis</i>	57
3.2.1 Proteinkristallisation	58

3.2.2 Kristallographische Identifizierung von Kationen im PorB _{W135} -Kanal.....	58
3.2.3 Moleküldynamische Studien des Ionentransportes im PorB _{W135} -Kanal.....	61
3.2.4 Antibiotikatransport in PorB _{W135} -Mutanten.....	64
3.2.5 Zuckertransport in PorB _{W135} -Mutanten	69
3.2.6 Kristallstrukturen von PorB _{W135} -G103K und -G103D	70
3.2.7 Kristallstruktur von PorB _{W135} nach <i>soaking</i> -Experimenten mit Ampicillin.....	72
3.3 PorB _B aus <i>Neisseria meningitidis</i>	74
3.3.1 Proteinkristallisation	74
3.3.2 Struktur von PorB _B und PorB _{AKR}	75
3.3.3 PorB _{AKR} im Komplex mit Ziträt.....	76
3.3.4 Konformationen der extrazellulären <i>loops</i> , impliziert in der TLR-Bindung.....	78
3.3.5 Zuckertransport in PorB _B nach Rekonstitution in Proteoliposomen.....	82
3.4 Interaktionsstudien zwischen PorB und dem humanen TLR 2.....	83
3.4.1 Auswahl des Expressionssystems zur Produktion des humanen TLR 2.....	83
3.4.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung von sTLR2 in <i>P. pastoris</i>	84
3.4.1.2 Klonierung, Expression und Reinigung von sTLR2 in <i>S. cerevisiae</i>	85
3.4.2 Interaktion zwischen PorB _B und dem humanen TLR 2	93
3.5 OmpP2 aus <i>Haemophilus influenzae</i>	98
3.5.1 Proteinkristallisation	98
3.5.2 Zuckertransport in OmpP2 nach Rekonstitution in Proteoliposomen	99
3.6 FomA aus <i>Fusobakterium nukleatum</i>	101
3.6.1 Proteinkristallisation	101
3.6.2 Zuckertransport in FomA nach Rekonstitution in Proteoliposomen	102
4 Diskussion	103
4.1 Vergleich mit weiteren Membranproteinen äußerer Membranen.....	103
4.2 Einfluss des Ionentransportweges in PorB	106
4.3 Der Antibiotikatransport in bakteriellen Porinen.....	109
4.4 Vergleich verschiedener Transportwege in PorB	114
4.5 Interaktionsmechanismus zwischen PorB und TLR2	116
4.6 Die Rolle weiterer Porine.....	120

5 Zusammenfassung	123
6 Ausblick	124
7 Literaturverzeichnis.....	125
Anhang.....	143
Danksagung.....	158
Lebenslauf.....	159
Publikationen/Präsentationen.....	160
Erklärung.....	161

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1:** Struktureller Aufbau der Zellwand gramnegativer Bakterien.
- Abb. 1.2:** Proteinstruktur verschiedener bakterieller β -barrel Proteine der äußeren Membran.
- Abb. 1.3:** Porinstruktur und Faltung von *loop 3* (L3) im Kanal.
- Abb. 1.4:** Ladungsverteilung in der Konstriktionszone von OmpF.
- Abb. 1.5:** PorB-induzierte Reorganisation der inneren mitochondrialen Membran.
- Abb. 1.6:** Strukturdarstellung von PorB_{W135} aus *N. meningitidis*.
- Abb. 1.7:** Homologie-basierendes Strukturmodell eines OmpP2-Monomers aus *H. influenzae*.
- Abb. 1.8:** Vermutetes FomA-Topologiemodell.
- Abb. 1.9:** Ablauf der Immunzellen-Aktivierung durch PorB_{men}.
- Abb. 1.10:** PorB_B-Varianten aus *N. meningitidis* induzieren eine unterschiedlich starke Immunantwort.
- Abb. 3.1:** Analyse der thermischen Entfaltungsübergänge von OmpP2 gemessen mit Fern-UV-Circulardichroismus.
- Abb. 3.2:** Größenausschlusschromatographie (SEC) nach IB-Reinigung, Solubilisierung und Renaturierung der exprimierten Porine.
- Abb. 3.3:** Analyse der SEC-Fractionen durch Messung der thermischen Entfaltungsübergänge.
- Abb. 3.4:** SDS-PAGE-Analyse des Reinigungsverlaufes von PorB_B und Darstellung des finalen Reinheitsgrades weiterer verwendeter Porine nach erfolgter Proteinreinigung.
- Abb. 3.5:** Analyse der Sekundärstruktur der nativen Porine durch Fern-UV-Circulardichroismus.
- Abb. 3.6:** Darstellung der identifizierten Cäsiumionen.
- Abb. 3.7:** Darstellung der Interaktion zwischen PorB und Cs⁺.
- Abb. 3.8:** Moleküldynamikanalyse von Ionen im PorB-Kanal.
- Abb. 3.9:** MD-Kontaktanalyse und Überlagerung von Cs⁺- und Cl⁻-Ionen im PorB-Kanal.
- Abb. 3.10:** PorB-Sequenzalignment.
- Abb. 3.11:** Molekülstruktur der eingesetzten Antibiotika.
- Abb. 3.12:** Position von Gly103 im PorB_{W135}-Kanal.
- Abb. 3.13:** Antibiotikatransport in PorB_{W135} G103D und G103K.
- Abb. 3.14:** Antibiotikatransport in PorB_{W135}-Mutanten.
- Abb. 3.15:** Zuckertransport in PorB_{W135}-Mutanten.
- Abb. 3.16:** Konformation von G103K und G103D.
- Abb. 3.17:** Zusätzliche Elektronendichte nach *soaking* mit Ampicillin.

- Abb. 3.18:** Kristallbilder von PorB_B und PorB_{AKR}.
- Abb. 3.19:** Strukturvergleich bekannter PorB-Moleküle und Kristallanordnung von PorB_B und PorB_{AKR}.
- Abb. 3.20:** PorB_{AKR}-Kristallstruktur im Komplex mit Zitrat.
- Abb. 3.21:** Strukturdarstellung für PorB_B und PorB_{AKR}.
- Abb. 3.22:** Analyse der L7-Konformation durch Computer- und Moleküldynamik-Simulationen.
- Abb. 3.23:** Vergleich der elektrostatischen Oberflächen unterschiedlicher PorB-Moleküle.
- Abb. 3.24:** Zuckertransport in PorB_B-Proteoliposomen.
- Abb. 3.25:** Western-Blot-Analyse der Expression des sTLR2VLRB in *P. pastoris*.
- Abb. 3.26:** SDS-PAGE-Analyse der sTLR2-Expression in *S. cerevisiae* durch GFP-Fluoreszenz.
- Abb. 3.27:** Testsolubilisierung von MBP_sTLR2VLRB_GFP.
- Abb. 3.28:** SDS-PAGE-Analyse der Ni-NTA-Reinigung von MBP_sTLR2VLRB_GFP und anschließender GFP-Fluoreszenzdetektion.
- Abb. 3.29:** FSEC-Chromatogramme mit gereinigtem MBP_sTLR2VLRB_GFP.
- Abb. 3.30:** SDS-PAGE-Analyse des Stabilitätstests von MBP_sTLR2VLRB_GFP durch GFP-Fluoreszenzdetektion.
- Abb. 3.31:** SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von MBP_sTLR2VLRB_GFP.
- Abb. 3.32:** SDS-PAGE-Analyse des Enterokinaseverdaus von MBP_sTLR2VLRB_GFP durch GFP-Fluoreszenz.
- Abb. 3.33:** Western-Blot-Analyse des TEV-Verdaus von MBP_sTLR2VLRB_GFP.
- Abb. 3.34:** *pull-down*-Assay mit PorB_B und MBP_sTLR2VLRB_GFP.
- Abb. 3.35:** SDS-PAGE-Analyse des *pull-down*-Assays mit PorB_B und sTLR2Fc nach Silberfärbung.
- Abb. 3.36:** SEC-Chromatogramm und SDS-PAGE zur Analyse der PorB_B-sTLR2Fc-Interaktion.
- Abb. 3.37:** Kristallwachstum und Kristallbeugungsreflexe.
- Abb. 3.38:** Zuckertransport in OmpP2-Proteoliposomen.
- Abb. 3.39:** Kristallwachstum in unterschiedlichen Bedingungen.
- Abb. 3.40:** Zuckertransport in FomA-Proteoliposomen.

Abb. 4.1: Darstellung von B-Faktoren verschiedener Porine.

Abb. 4.2: Ladungsverteilung im Kanal bakterieller Porine sowie dem murinen VDAC.

Abb. 4.3: Position von AMP-PNP im Ionen-Translokationsweg von PorB_{W135}.

Abb. 4.4: Position von Ampicillin in *E. coli* OmpF und Vergleich mit PorB_{W135}.

Abb. 4.5: PorB mit komplexierten Liganden.

Abb. 4.6: TLR1-TLR2-Komplex.

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Parameter der thermisch-induzierten Entfaltung der Porine.

Tab. 3.2: Proteinausbeuten der Porin-Expressionen aus einem 400 ml-Kulturvolumen.

Tab. 3.3: Rekombinante *S. cerevisiae*-Stämme zur Generierung des sTLR2.

Abkürzungsverzeichnis

AMP-PNP	Adenylylimidodiphosphat
Anzergent 3-14	n-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat
APBS	<i>Adaptive Poisson-Boltzmann Solver</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriophosphat
C ₁₂ E ₉	Nonaethylenglykolmonododekylether
C ₈ E ₄	Tetraethylenglykolmonooktylether
CD	Circulardichroismus
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propansulfonat
CMC	<i>critical micelle concentration</i> (kritische Mizellbildungskonzentration)
Cymal-6	Cyclohexyl-β-D-maltosid
Da	Dalton
DDM	n-Dodecyl-β-D-maltopyranosid
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fos14	n-Tetradekylphosphocholin
FSEC	<i>fluorescence-detection size-exclusion chromatography</i> (Fluoreszenz-Größenausschlusschromatographie)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün-fluoreszierendes Protein)
GTP	Guanosintriophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hib	(Sero)-Typ b <i>Haemophilus influenzae</i>
IB	<i>inclusion body</i> (Einschlusskörper)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i> (isothermale Titrationskalorimetrie)
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule

LDAO	Lauryldimethylaminoxid
LMNG	Laurylmaltoseneopentylglykol
LPS	Lipopolysaccharid
MD	Moleküldynamik
MDR	<i>multi drug resistance</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MR	<i>molecular replacement</i> (molekularer Ersatz)
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> (molekulare Größenausschlussgrenze)
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NM	n-Nonyl- β -D-maltopyranosid
NTHi	untypisierbare Serotypen <i>Haemophilus influenzae</i>
OG	n-Oktyl- β -D-glukosid
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PMF	<i>potential of mean force</i>
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RMSD	<i>root-mean-square deviation of atomic positions</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
TDDG	n-Tetradecyl-N,N-dimethylglyzin

TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TLR	Toll- <i>like</i> Rezeptor
T _m	Temperatur-Übergangsmittelpunkt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VDAC	<i>voltage dependent anion channel</i>
VLRB	<i>variable lymphocyte receptor B</i>

Abkürzungen diskutierter Proteine, Serogruppen und Organismen

PorB _{W135}	PorB Serogruppe W135 aus <i>Neisseria meningitidis</i>
PorB _B	PorB Serogruppe B aus <i>Neisseria meningitidis</i>
PorB _{AKR}	PorB Serogruppe B AKR-Mutante aus <i>Neisseria meningitidis</i>
N _{men}	<i>Neisseria meningitidis</i>
N _{gon}	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
N _{lac}	<i>Neisseria lactamica</i>
PorB _{men}	PorB aus <i>N. meningitidis</i>
PorB _{gon}	PorB aus <i>N. gonorrhoeae</i>
PorB _{lac}	PorB aus <i>N. lactamica</i>
sTLR2	extrazelluläre (Ekto-) Domäne des humanen Toll- <i>like</i> Rezeptors 2

Aus dem Englischen übernommene Begriffe werden in *kursiver Schreibweise* geschrieben. Aminosäuren sind mit ihrem Einbuchstaben- bzw. Dreibuchstabencode gemäß der biochemischen Nomenklatur aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion bakterieller Zellmembranen

Die Funktion von Biomembranen liegt in der Abgrenzung der Zelle gegenüber ihrer Umgebung bzw. in der Bildung definierter Kompartimente in eukaryontischen Zellen. Bakterielle Zellmembranen, welche aus einer Lipiddoppelschicht bestehen, stellen im Gegensatz zur permeableren Zellwand eine Stoffbarriere dar, durch welche ein regulierter Transport essentieller Moleküle möglich ist.

Bakterien werden anhand des unterschiedlichen Aufbaus ihrer Zellwand in gramnegative und grampositive Bakterien eingeteilt (Gram, 1884). Während in grampositiven Bakterien der inneren Zellmembran eine aus mehreren Peptidoglykanschichten formgebende Zellwand aufgelagert ist, besteht diese Zellwand in gramnegativen Bakterien aus nur einem dünnen Peptidoglykanpolymer, welches von einer zweiten Lipiddoppelschicht (äußere Membran) umschlossen wird, wodurch der periplasmatische Raum zwischen beiden Membranen definiert wird (Abb. 1.1). Diese externe Lipiddoppelschicht setzt sich zum Teil aus charakteristischen Lipopolysaccharidmolekülen (LPS) zusammen und ist im Gegensatz zur inneren Membran stark asymmetrisch (Van Heijenoort, 2001).

Darüber hinaus sind in beiden Membranen Proteine eingelagert. Während in der inneren Membran zum größten Teil α -helikale Membranproteine präsent sind, die Funktionen in der Signalkontrolle, Reizvermittlung und des spezifischen Austausches von Molekülen haben, besteht die äußere Membran zu etwa 50% aus Proteinen, welche wiederum hauptsächlich eine β -Faltblatt-Struktur als Transmembrandomäne aufweisen (Koebnik *et al.*, 2000; Schulz, 2002). Im Vergleich zur inneren Membran, führt dieser relativ hohe Proteingehalt in der äußeren Membran zu einer permeableren Schicht, wobei diese Proteine häufig wenig spezifische Diffusionsporen (Porine) mit einem breiten Substratspektrum darstellen und als molekulares Sieb wirken (Nikaido, 1992). Membranverankerte Lipoproteine der äußeren Membran (Braunsche Lipoproteine) haben dabei zusätzlich die Aufgabe, die Membran an die Peptidoglykanschicht zu fixieren (Seltmann und Holst, 2002).

Für die Zellen sind Membranproteine somit die einzige Möglichkeit, essentielle Metabolite und Stoffe mit ihrer Umgebung auszutauschen, welche sonst für die beiden Lipiddoppelschichten nur schwer permeabel wären.

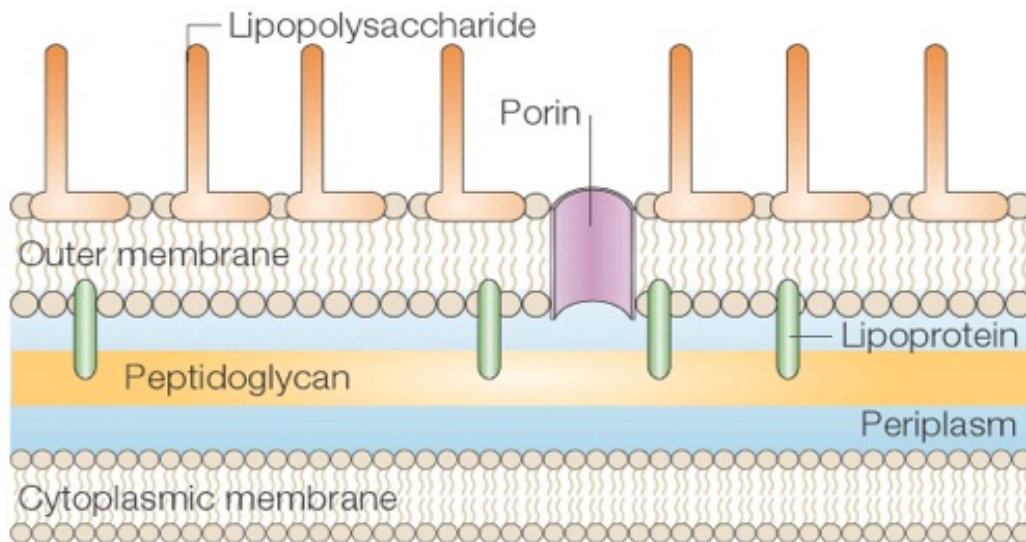


Abb. 1.1: Struktureller Aufbau der Zellwand gramnegativer Bakterien. Die äußere Membran (*outer membrane*) gramnegativer Bakterien ist durch Lipoproteine an eine dünne Einzelschicht aus Peptidoglykan fixiert, welche sich im periplasmatischen Raum (*periplasm*) zwischen der äußeren und inneren Membran (*cytoplasmic membrane*) befindet. In die äußere Membran sind Lipopolysaccharide aber auch integrale Membranporine eingelagert, welche den Austausch von kleinen, hydrophilen Molekülen erlauben (nach Cabeen und Jacobs-Wagner, 2005).

1.2 Klassifizierung von Proteinen der bakteriellen äußeren Membran

Membranproteine lassen sich allgemein in zwei Klassen einteilen. Integrale bzw. intrinsische Membranproteine können fest in den hydrophoben Kern der Lipiddoppelschicht eingelagert sein (Proteolipide, Lipophilin) oder durch sie hindurchtreten (Transmembranproteine). Periphere bzw. extrinsische Membranproteine sind mehr oder weniger stark oberflächlich an die Membran assoziierte Proteine. Sie sind über elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrücken funktionell mit der Membran verbunden. Im Gegensatz zu den integralen Membranproteinen gehen sie aber meistens keine hydrophoben Wechselwirkungen mit der Lipiddoppelschicht oder mit integralen Proteinen ein und können relativ leicht von der Membran abgelöst werden (Chelationen, Veränderung des Ionenmilieus).

Der Transport durch die äußere Membran von Stoffen aus der extrazellulären Umgebung in das Periplasma der bakteriellen Zelle und umgekehrt, erfolgt dabei durch integrale Membranproteine wie Autotransporter, Sekretionsproteine und Porine. Diese Moleküle weisen eine β -Faltblattstruktur (*β -barrel* oder β -Fass) auf und unterscheiden sich somit strukturell zu den integralen Proteinen der inneren Membran, deren Aufbau zum größten Teil aus α -helikalen Bereichen besteht (Schulz, 2002).

Proteine der äußeren Membran weisen in der Regel eine rechtsgängige β -barrel Faserstruktur mit anti-paralleler Anordnung auf und unterteilen sich in Strukturen mit einer geraden Zahl an β -Strängen im Bereich von 8-22. Als „klassische Porine“ werden meist die integralen Proteine der äußeren Membran bezeichnet, welche über eine Anzahl von etwa 14-18 β -Faltblättern verfügen und hauptsächlich passive Diffusionseigenschaften besitzen (Nikaido, 2003).

Die Stabilisierung des β -Fasses in der äußeren Membran erfolgt durch Kontaktflächen aus hydrophoben Proteinbereichen und den Fettsäureestern der Membranphospholipide, während der Kanal auf seiner Innenseite selbst meist hydrophil ist (Schulz, 2003).

Proteine der äußeren Membran mit acht β -Faltblattsträngen weisen die kleinste bekannte Anzahl an Faltblättern auf und lassen sich über ihre Sequenzhomologie einteilen. Die Funktion dieser Familie, in welcher die monomeren Proteine OmpA und OmpX aus *Escherichia coli* (*E. coli*) zu nennen sind (Naveed *et al.*, 2009, 2012), liegt primär in der Zelladhäsion (Pautsch und Schulz, 1998), wobei ebenfalls Eigenschaften einer antimikrobiellen Resistenz von OmpA (Smani *et al.*, 2013) bzw. einem pathogenen Effekt von OmpX (Vogt und Schulz, 1999) bekannt sind. Diese Klasse weist dabei nur einen sehr kleinen Kanalquerschnitt (Konstriktion) auf, wodurch eine Transportfunktion eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Roca *et al.*, 2011) (Abb. 1.2).

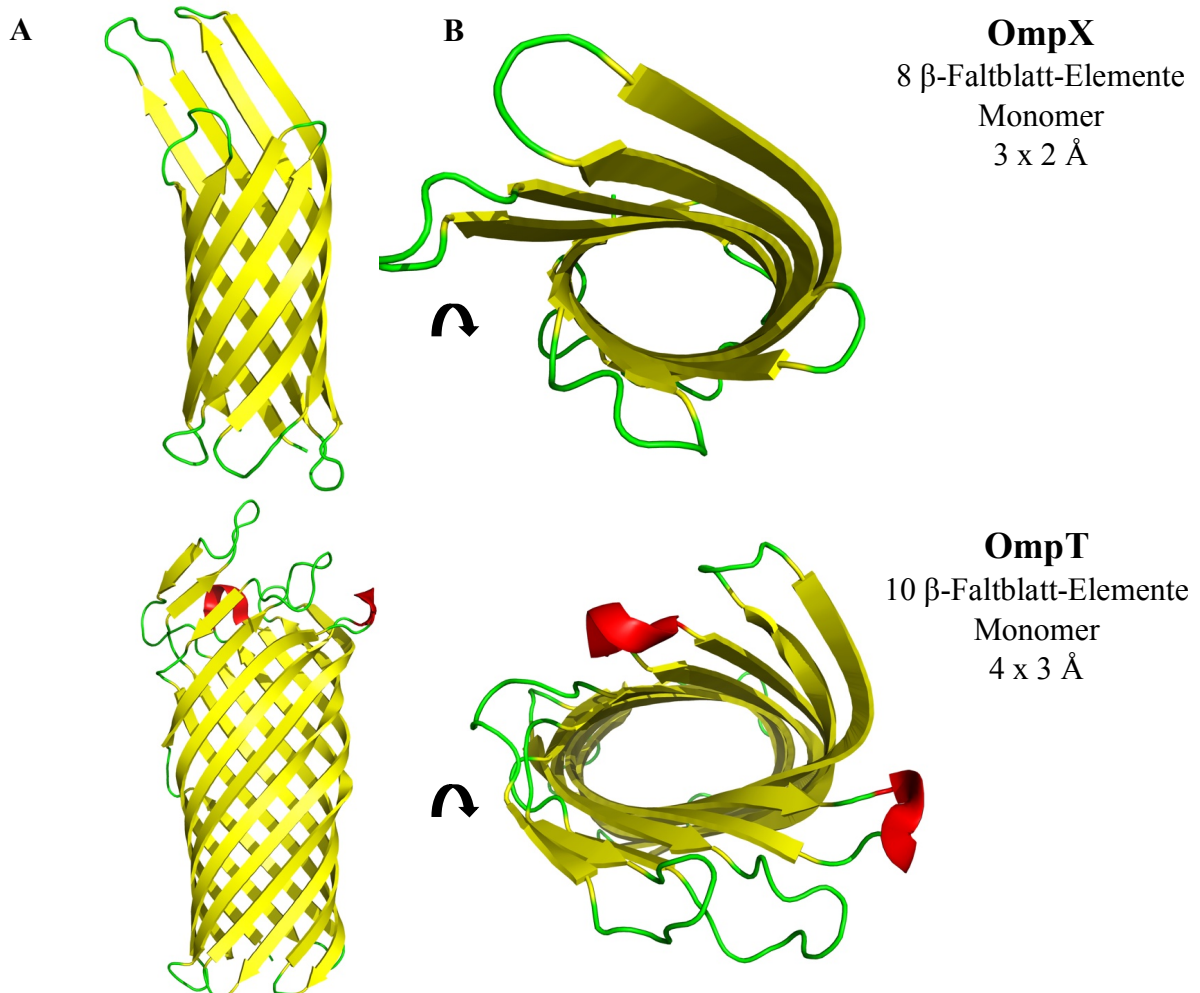
Die nächste Gruppe stellen Proteine mit zehn bzw. 12 β -Faltblättern dar, zu denen viele Enzyme wie beispielsweise die 10- β -Faltblatt-strängige Protease OmpT oder die 12- β -Faltblatt-strängige Phospholipase OmpLA gehören und als Dimer vorliegen (Naveed *et al.*, 2009, 2012). Sie sind an der bakteriellen Pathogenität beteiligt (Pathogenitätsfaktoren), da sie den Erregern Fähigkeiten in der Zellanhaftung und Zellinvasion verleihen, sind aber auch in der Sekretion von Virulenzfaktoren involviert (Vandeputte-Rutten *et al.*, 2001; Snijder *et al.*, 1999). Das 12-strängige β -barrel-Protein TolC wird ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt, welches aus vier monomeren, 4- β -Faltblatt-strängigen Untereinheiten besteht. Es hat seine Funktion im Transport von kleinen Metaboliten und Proteinen, nicht aber in einer enzymatischen Aktivität (Koronakis *et al.*, 2000).

Zur Gruppe der Proteine der äußeren Membran mit 14-16 β -Faltblattsträngen gehören die jeweils 16- β -faltblattsträngigen und in trimerer Konformation vorliegenden Proteine OmpF aus *E. coli*, Omp32 aus *Delftia acidovorans* und PorB aus *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) sowie das monomere, 14-strängige β -Faltblatt-Porin OmpG aus *E. coli* (Naveed *et al.*, 2009, 2012). Diese Gruppe von Porinen nimmt die Funktion des passiven, wenig spezifischen Transports von löslichen Substanzen ein, deren molekulare Ausschlussgröße von der Kanalkonstriktion bestimmt wird (Minetti *et al.*, 1997). Ihre

biologisch aktive Struktur ist in der Regel in einer trimeren Form mit jeweils einem eigenen Kanal in jeder Untereinheit ausgebildet. Obwohl der Transport passiv erfolgt, zeigt diese Poringruppe teilweise Selektivität für den Austausch von anionischen und kationischen Molekülen (Weiss und Schulz, 1992; Minetti *et al.*, 1997).

Neben passiven, wenig spezifischen Kanälen gehören Porine mit 18 β -Faltblattsträngen meist zu der Klasse von passiven, spezifischen Poren, wie das Maltose-transportierende Porin LamB (Schirmer *et al.*, 1995) oder das Saccharose-transportierende Porin ScrY (Forst *et al.*, 1998), mit spezifischen Substratbindungsstellen innerhalb des Kanals und somit dem bevorzugten Transport eines bestimmten Moleküls.

Die letzte bekannte Gruppe innerhalb der Klasse von Proteinen der äußeren Membran stellen Moleküle mit 22 β -Faltblättern dar, bei denen es sich ebenfalls um spezifische Transportmoleküle wie z.B. FhuA (Transport von Colicin M oder Ferrichrom, Braun, 2009) oder FecA (Transport von Eisenzitat, Härle *et al.*, 1995) aus *E. coli* handelt. Diese Proteine gehören zu den ATP-abhängigen Eisen-Transportproteinen und stellen somit die einzige Klasse mit aktivem Transport dar (Locher *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 1999; Braun und Braun, 2002; Ferguson *et al.*, 2002).



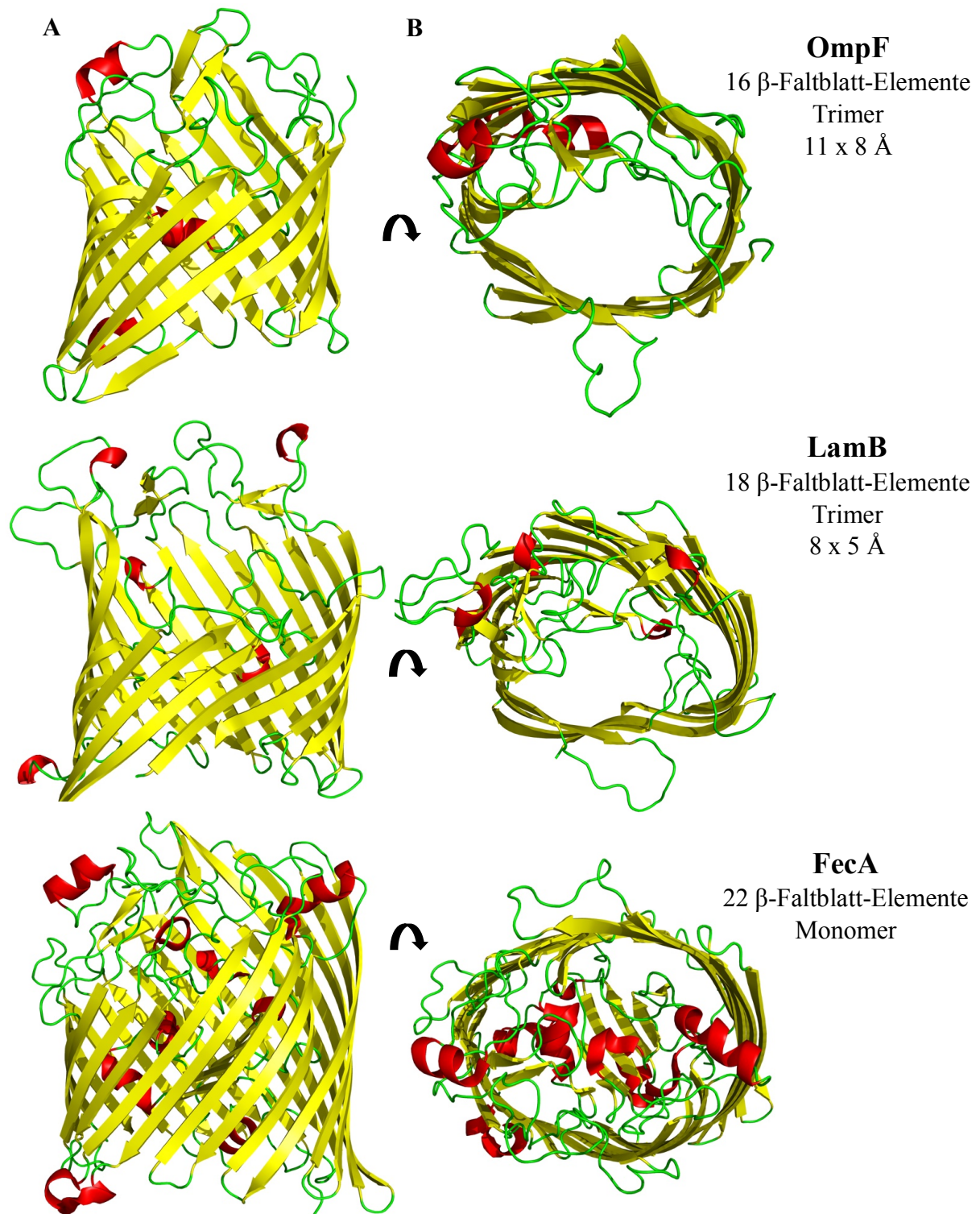


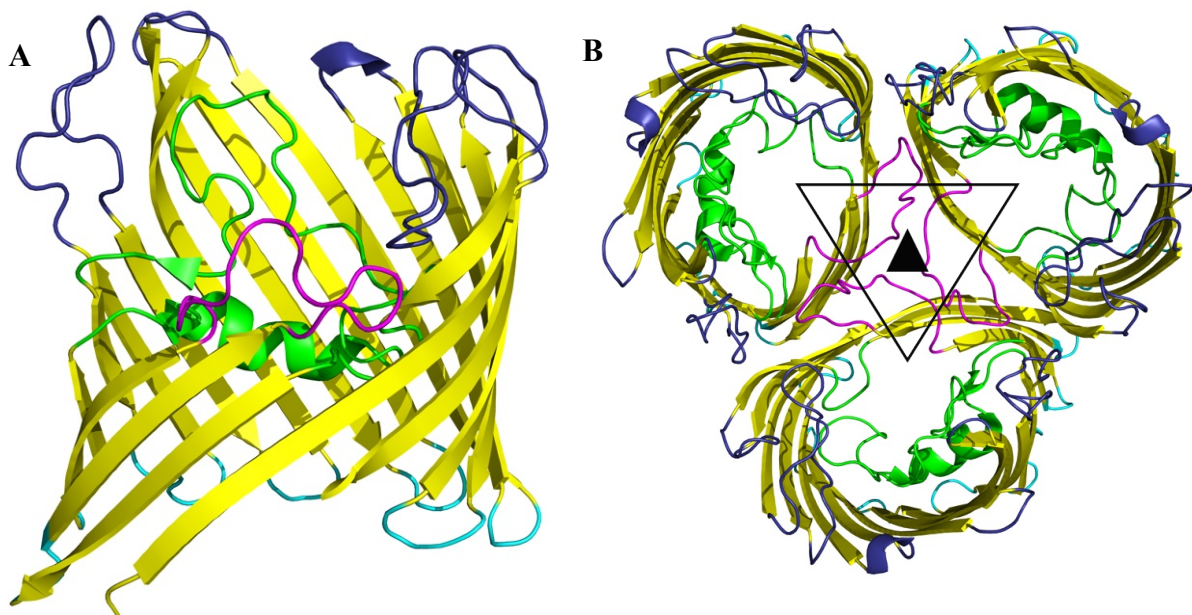
Abb. 1.2: Proteinstruktur verschiedener bakterieller β -barrel Proteine der äußeren Membran. Die Strukturen sind in *cartoon*-Darstellung mit eingefärbten Strukturelementen (β -Faltblatt gelb, *loop* grün, α -Helix rot) von der (A) Membranseite und (B) extrazellulären Seite gezeigt. Dabei wurden die PDB-Einträge 1QJ8 (OmpX, Vogt und Schulz, 1999), 1I78 (OmpT, Vandeputte-Rutten *et al.*, 2001), 2ZFG (OmpF, Yamashita *et al.*, 2008), 1MPM (LamB, Dutzler *et al.*, 1996) und 1KMO (FecA, Ferguson *et al.*, 2002) zur Darstellung verwendet. Gezeigt sind zusätzlich Informationen über die Anzahl der β -Faltblattelemente, der biologisch aktiven Konformation sowie den Durchmesser an der engsten Stelle im Kanal.

1.3 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften ausgewählter Membranporine

Trotz der großen Vielzahl unterschiedlicher β -barrel Proteinklassen, stellen 14-16-strängige, passive Diffusionsporine den Hauptteil der in der bakteriellen äußeren Membran vorkommenden Proteine dar (Nikaido, 2003).

Die Porine gramnegativer Bakterien liegen meist als trimere Strukturen innerhalb der Membran vor und weisen neben den formgebenden β -Faltblättern lange, extrazelluläre *loops* und kurze periplasmatische *turns* auf (Abb. 1.3A). Liegt eine trimere Porinstruktur vor, wird diese für gewöhnlich über die gegenseitige Wechselwirkung des *loop 2* (L2) stabilisiert (Abb. 1.3B). Porin-Sequenzvergleiche zeigen dabei eine signifikant hohe Identität innerhalb der Transmembranbereiche und eine hohe Variabilität der extrazellulären *loops* auf (Tanabe *et al.*, 2010).

Porine weisen häufig eine Konstriktion (Engstelle) innerhalb des Kanals auf, welche den Transport von löslichen Molekülen durch das Porin determiniert. Oftmals faltet ein Strukturelement (häufig handelt es sich dabei um *loop 3*, L3) zurück in die Pore und verengt auf diese Weise den Kanal mit Auswirkungen auf den Transport (Schulz, 2002) (Abb. 1.3B). In diesem Zusammenhang wird davon ausgegangen, dass der Porinkanal eine spannungsabhängige Öffnung und Schließung mit diesem *loop* durchführen kann (*gating*), wobei das Prinzip dieses Mechanismus nicht bekannt ist (Nikaido, 2003). Studien mit dem in der Membran als Monomer vorliegenden, 14-strängigen β -barrel-Porin OmpG aus *E. coli* zeigten pH-abhängige, strukturelle Auswirkungen auf die gefaltete Engstelle und somit den Einfluss dieser Domäne auf den Mechanismus (Yildiz *et al.*, 2006) (Abb. 1.3C, D).



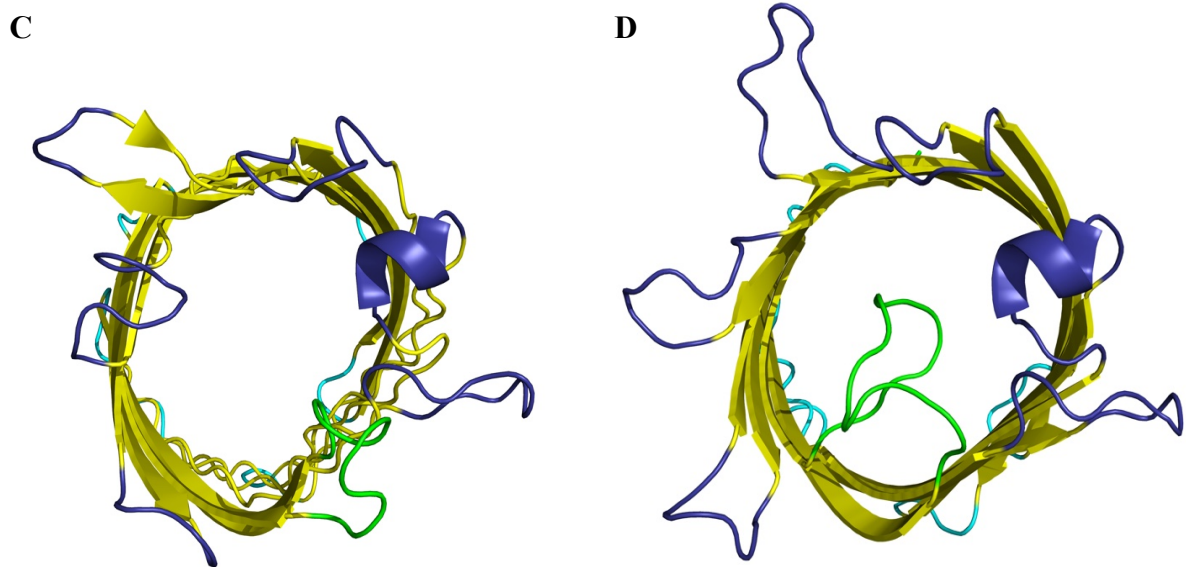


Abb. 1.3: Porinstruktur und Faltung von *loop 3* (L3) im Kanal. Von der (A) Membranseite ist eine monomere Untereinheit (β -Faltblatt gelb, extrazelluläre *loops* blau, periplasmatische *turns* cyan, *loop 2* (L2) magenta, *loop 3* (L3) grün) des aus 16 β -Faltblattelementen bestehenden Porins Omp32 aus *Delftia acidovorans* (2FGR, Zachariae *et al.*, 2006) gezeigt. (B) Dargestellt ist zusätzlich die native, trimere Struktur des Omp32 von der extrazellulären Seite mit eingezeichneter Trimer-Symmetrieachse. Das nativ als Monomer vorliegende Porin OmpG aus *E. coli* ist in der (C) offenen (2IWV, Yldiz *et al.*, 2006) als auch (D) geschlossenen Konformation (2IWW, Yldiz *et al.*, 2006) mit dem flexiblen L3 dargestellt.

Der schmalste Bereich des Kanals (Konstriktionszone) weist häufig eine charakteristische Verteilung geladener Aminosäuren auf, die wesentliche Auswirkungen auf die elektrostatischen Eigenschaften der Pore haben. Beispielsweise stehen in OmpF (Abb. 1.4A) negativ geladene Aminosäurereste des L3, einem Cluster aus positiv geladenen Arginin-Resten vom entgegengesetzten β -Fassbereich gegenüber. Dadurch erfährt die Konstriktionszone eine strikte Ladungstrennung (Abb. 1.4B), wobei der im jeweiligen Porin vorliegende Ladungszustand im Zusammenspiel mit der vorliegenden Kanalgeometrie die Selektivität für anionische und kationische Moleküle charakterisiert (Im und Roux, 2002; Zachariae *et al.*, 2006).

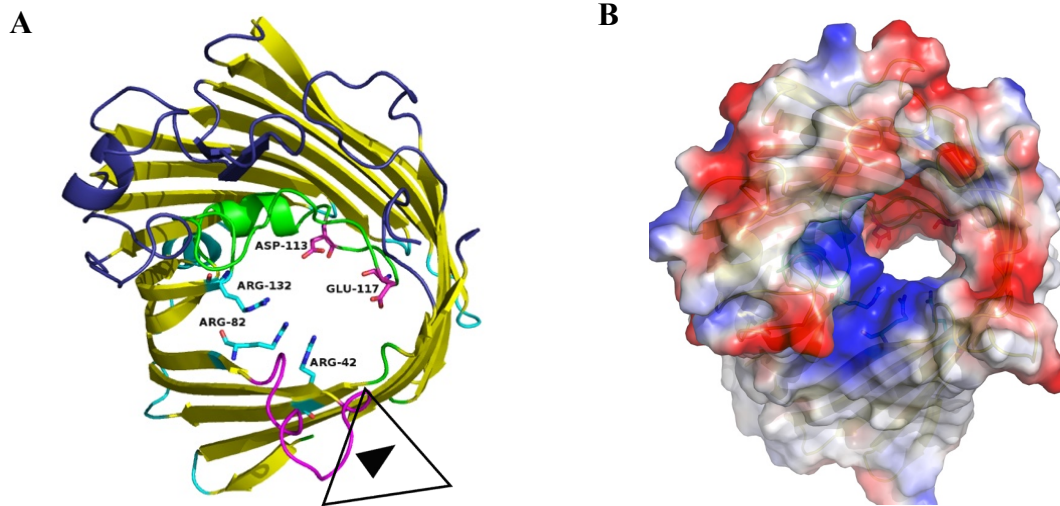


Abb. 1.4: Ladungsverteilung in der Konstriktionszone von OmpF. (A) Gezeigt ist die *cartoon*-Darstellung von OmpF aus *E. coli* (2ZFG, Yamashita *et al.*, 2008) zusammen mit dem positiv geladenen Arginin-Cluster (R42, R82, R132, C-Atome cyan, N-Atome blau, O-Atome rot) und den am L3 (grün) lokalisierten, negativ geladenen Seitenketten von D113 und E117 (C-Atome magenta, N-Atome blau, O-Atome rot). Extrazelluläre *loop*-Bereiche sind blau, periplasmatische turns cyan und L2 magenta eingefärbt. Des Weiteren ist die Trimer-Symmetrieachse von OmpF eingezeichnet. (B) Die elektrostatische Oberfläche von OmpF ist mit dem *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS, Baker *et al.*, 2001) berechnet und von der extrazellulären Seite gezeigt. Bereiche mit positivem Potential sind blau, Bereiche mit negativem Potential rot dargestellt und von -20kT/e bis +20kT/e konturiert. Durch die stark getrennte Position geladener Reste in der Engstelle entsteht eine lokale Ladungsteilung innerhalb des Porin-Kanals.

1.3.1 PorB aus *Neisseria meningitidis*

1.3.1.1 Das Pathogen *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis (N_{men}) und *Neisseria gonorrhoeae* (N_{gon}) sind die einzigen bekannten pathogenen Arten der Gattung *Neisseria*. Sie verursachen Krankheiten wie bakterielle Meningitis, Sepsis und Gonorrhö mit weltweit 1,2 Mio. Infektionen und etwa 135.000 Todesfällen, die hauptsächlich Säuglinge und Kinder unter vier Jahren betreffen. In diesem Zusammenhang zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen Ländern weltweit, mit einer signifikant höheren Anzahl an Neuerkrankungen in Gebieten mit einer schlechten Gesundheitsversorgung (Tan *et al.*, 2010).

N_{men} wird anhand seiner Oberflächenstruktur in 13 Serogruppen eingeteilt (A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y, Z), wenngleich weltweit über 90% aller Infektionen durch die Serogruppen A, B, C, X, W135 und Y verursacht werden. In Deutschland werden jährlich etwa 800 neue Infektionen gemeldet, welche auf die Serogruppe B (70%), C (20%),

W135 (5%) und Y (etwa 2%) entfallen. Durchschnittlich beträgt die Letalität etwa 10% (RKI, 2012). Allgemein ist die Zahl an Neuerkrankungen weltweit fallend, was hauptsächlich auf die Entwicklung und den Einsatz von zwei effektiven Impfstoffen zurückzuführen ist. Beide Impfstoffe (Polysaccharid- bzw. Konjugat-Impfstoffe) enthalten jeweils gereinigte, bakterielle Polysaccharide der vier Serogruppen A, C, Y und W135. Auf diese Weise kann gegenüber diesen vier Serogruppen ein effektiver Schutz über einen Zeitraum von etwa fünf Jahren erzielt werden.

Trotz des stetigen Fortschrittes auf dem Gebiet der Impfstoffentwicklung, konnten jahrzehntelang keine effektiven Impfstoffe gegen die Serogruppe B produziert werden, da ihre LPS-Struktur aufgrund einer zu großen Ähnlichkeit zu menschlichen, neuronalen Zelladhäsionsmolekülen als Leitstruktur nicht eingesetzt werden konnte (Finne *et al.*, 1983). Erst Anfang 2013 wurde der erste Konjugat-Impfstoff gegen die Serogruppe B, erstmalig nur in der Europäischen Union, zugelassen (Bexsero, Novartis). In diesem Zusammenhang könnte die Aufklärung der dreidimensionalen Proteinstruktur des Porins PorB der Serogruppe B (PorB_B), welche eine Zielstruktur des humanen Immunsystems darstellt, ein möglicher Anhaltspunkt im Verständnis dieser unzureichenden Identifizierung durch Zellen des menschlichen Immunsystems sein.

1.3.1.2 Transportfunktion und pathogener Einfluss von PorB

Als allgemeines, wenig spezifisches Diffusionsporin führt PorB den passiven Transport von löslichen Metaboliten wie Ionen, Zuckern, Nukleotiden und Antibiotika durch, mit einer Molekulargewichtsausschlussgröße von etwa 600 Da (Minetti *et al.*, 1997). Untersuchungen der spannungsabhängigen Kanalöffnung und -schließung (*gating*) zeigten in Leitfähigkeitsmessungen eine schwache Selektivität für Anionen gegenüber Kationen (Song *et al.*, 1998), wobei das *gating* sequentiell in einem einzelnen Monomer oder auch simultan im Trimer ausgeführt werden kann (Jadhav *et al.*, 2008, 2012).

PorB ist als charakteristisches Muster (pathogen-assoziiertes molekulares Muster, engl. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) direkt an der Initiierung der Immunantwort beteiligt. Als Erkennungsmuster für spezifische Oberflächenmoleküle (*pattern-recognition receptor*, PRR) menschlicher Immunzellen, den Toll-like Rezeptoren, induziert ein PorB-TLR-Komplex die intrazelluläre Signalkaskade (Massari *et al.*, 2002). PorB kann die Signaltransduktion in infizierten Wirtszellen über den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und den

Toll-like Rezeptor 1 (TLR1) induzieren, wobei als Ergebnis des PorB-TLR2-TLR1-Komplexes die Immunantwort ausgelöst wird (Massari *et al.*, 2002, 2006; Toussi *et al.*, 2012b). Aufgrund seines stark stimulierenden Effektes auf die eukaryontische Immunantwort, wird sein möglicher Einsatz als potentieller Adjuvanz in der Entwicklung neuer Impfstoffe diskutiert (Burke *et al.*, 2007; Chiavolini *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008b; Mackinnon *et al.*, 1999; Wetzler *et al.*, 1996) und erfolgreich industriell eingesetzt (Fusco *et al.*, 1998; Livingston *et al.*, 1993).

Neben der Funktion als Transportkanal und der Auslösung der Wirt-Immunantwort (Signalkaskade), ist auch ein direkter pathogener Einfluss von PorB aus N_{men} (PorB_{men}) und N_{gon} (PorB_{gon}) bewiesen. So kann PorB nicht nur an die Membran von infizierten Epithelzellen binden und in sie eingebaut werden (Weel *et al.*, 1991), sondern wird ebenfalls nach erfolgter Invasion zu den Mitochondrien geleitet, wo es zuerst vom mitochondrialen TOM-Komplex (*translocase of outer mitochondrial membrane*) erkannt und gebunden wird, welcher in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. (Massari *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2000, 2002; Kozjak-Pavlovic *et al.*, 2009). Der nachfolgende effektive Einbau von PorB in die innere Mitochondrienmembran des Wirtes erfolgt im direkten Anschluss über die beiden Komplexe von SAM (*sorting and assembly machinery*) und TIM (*translocase of inner mitochondrial membrane*), welche sich jeweils in der inneren Mitochondrienmembran befinden (Jiang *et al.*, 2011). Die hohe ATP-Konzentration im Mitochondrium kann in Folge dessen zu einer nicht-kovalenten PorB-ATP-Bindung führen, die eine offene PorB-Kanalkonformation induziert (Rudel *et al.*, 1996; Kozjak-Pavlovic *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass der Einbau von PorB in die innere Mitochondrienmembran einen unregulierten Ionenfluss induziert, welcher durch die ATP-abhängige, offene Kanalkonformation begünstigt wird. Das Resultat ist anschließend eine Änderung des Transmembranpotentials der Mitochondrien, wodurch die Zelle in Folge dessen ein modifiziertes Apoptoseverhalten zeigt (Kozjak-Pavlovic *et al.*, 2009; Massari *et al.*, 2000, 2010; Follows *et al.*, 2009). Als Folge konnten teilweise typische Apoptoseverhalten identifiziert werden, welche sich in einer Kondensation der mitochondrialen Cristae- als auch Matrixstruktur bis hin zum ihrem vollständigen Verlust manifestieren konnte (Abb. 1.5).

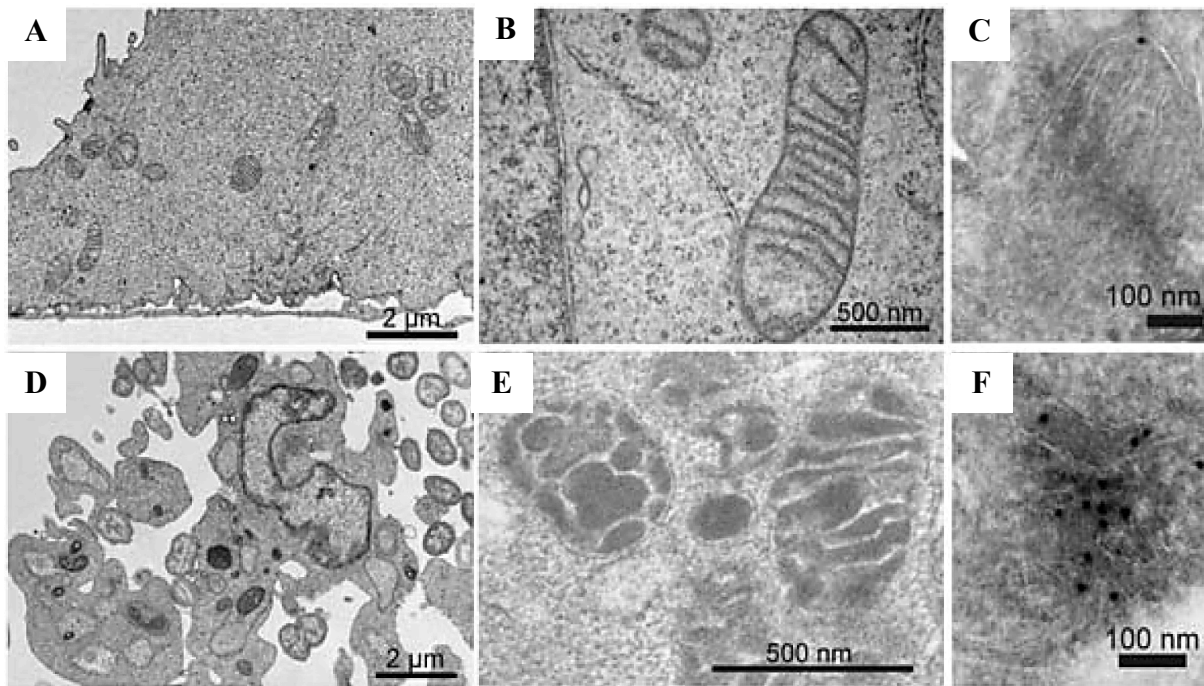


Abb. 1.5: PorB-induzierte Reorganisation der inneren mitochondrialen Membran. Elektronenmikroskopie-Aufnahmen von HeLa-Zellen ohne (A, B) und nach N_{gon} -Inkubation (D, E). (F) Mit $PorB_{gon}$ transfizierte Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle (C) einen deutlichen Verlust mitochondrialer Matrix- und Cristastruktur in Anwesenheit von $PorB_{gon}$. $PorB$ -Moleküle mit flankierenden FLAG-Sequenzen wurden antikörperspezifisch über die Immunogold-Markierung detektiert (Kozjak-Pavlovic *et al.*, 2009).

1.3.1.3 Struktureller Aufbau von $PorB_{W135}$

Die aufgelöste Struktur von $PorB_{men}$ der Serogruppe W135 ($PorB_{W135}$) zeigt eine für Proteine der äußeren Membran typische Fassstruktur mit 16 anti-parallel verlaufenden β -Faltblättern, neun (L1-L9) extrazellulären langen *loops* und acht kurzen periplasmatischen *turns* (Abb. 1.6A) (Tanabe *et al.*, 2010). $PorB_{W135}$ besitzt eine trimere Struktur aus drei monomeren Untereinheiten, welche über L2 jedes einzelnen Monomers stabilisiert wird (Abb. 1.6B). L3 faltet charakteristisch in die Pore und begrenzt den Kanal auf $8 \times 10 \text{ \AA}$ an der engsten Stelle. Co-Kristallisationsexperimente mit Einfachzuckern zeigten identische Bindestellen für Saccharose und Galaktose innerhalb eines positiv geladenen Bereiches, welcher zuvor in anderen Zuckerbindeproteinen identifiziert worden ist (Tanabe *et al.*, 2010). Im Vergleich zu den meisten Porinen weist auch $PorB$ eine strikte Ladungsverteilung innerhalb der Konstriktionszone auf, mit einem weitestgehend negativ geladenen L3 und einem konservierten, positiv geladenen Arg/Lys-Cluster auf der gegenüberliegenden Wand der Fassstruktur. Dabei wurde diskutiert, dass dieses Motiv innerhalb eines Anionen-

Translokationsweges liegt (Zachariae *et al.*, 2006; Lou *et al.*, 1996; Tanabe *et al.*, 2010). Moleküldynamikanalysen (MD) in PorB_{W135} (Abb. 1.6C) zeigten einen räumlich getrennt voneinander ablaufenden, simultanen Durchfluss von Anionen (entlang des Arg/Lys-Clusters an der β -barrel Wand) und Kationen (mehr zum L3 orientiert), welche die Vermutung einer Präsenz von speziellen Translokationswegen für Anionen und Kationen bekräftigen (Kutzner *et al.*, 2011)

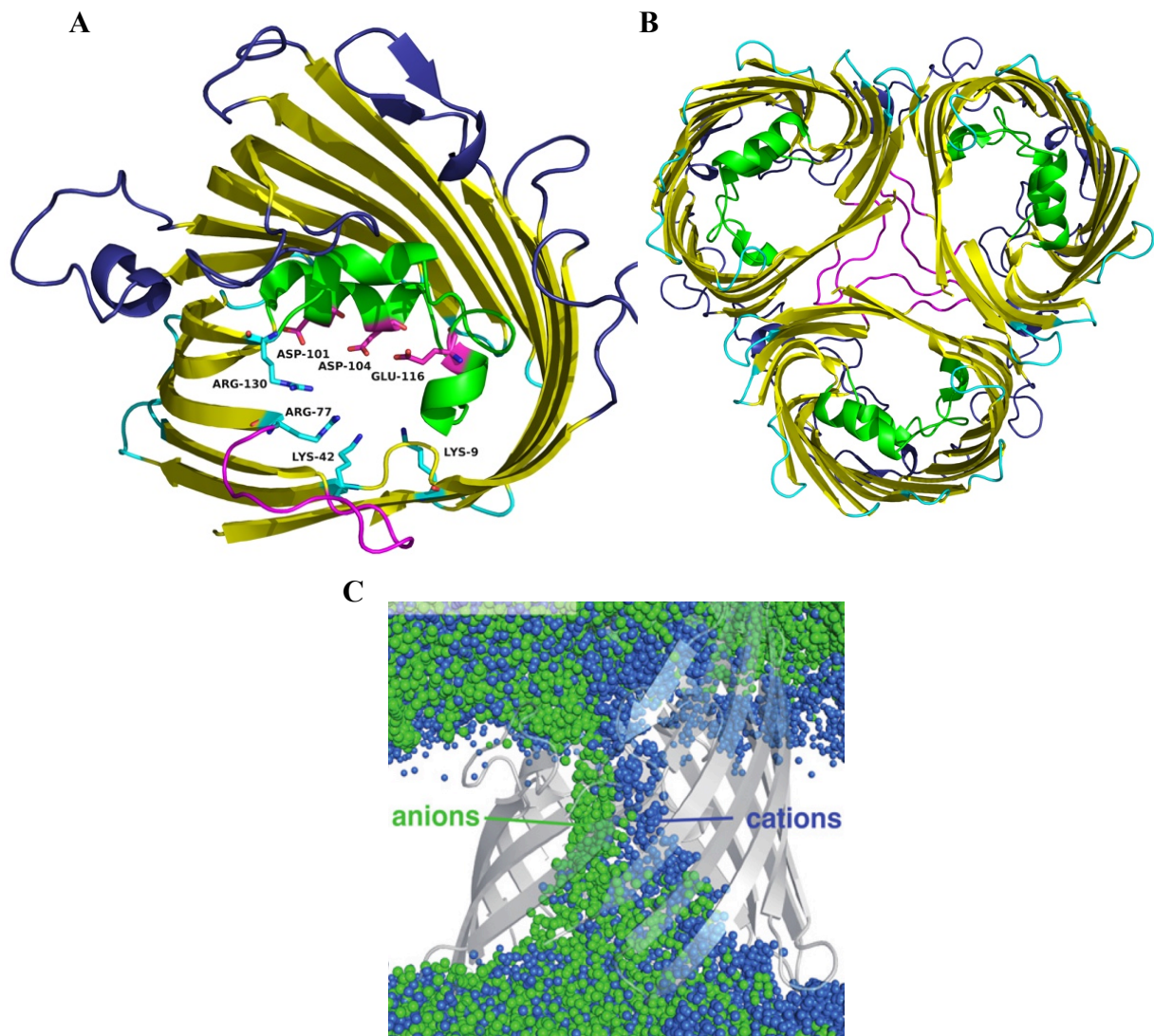


Abb. 1.6: Strukturdarstellung von PorB_{W135} aus *N. meningitidis*. (A) PorB_{W135} (3A2R, Tanabe *et al.*, 2010) ist als *cartoon*-Darstellung mit eingefärbten sekundären Strukturelementen (β -Faltblatt gelb, *loops* grün, Helix rot), dem positiv geladenen Arg/Lys-Cluster (C-Atome cyan, N-Atome blau, O-Atome rot) und den negativ geladenen D101, D104 und E116 (C-Atome magenta) in Stabdarstellung gezeigt. *Loop 3* (L3) ist in gelb und *loop 2* (L2) in magenta dargestellt. (B) Darstellung der biologisch aktiven, trimeren Struktur von PorB_{W135}, in welcher die drei L2 den trimeren Aufbau stabilisieren. Zusätzlich ist die Trimer-Symmetrieachse von PorB_{W135} eingezeichnet. (C) MD-Analysen zeigen getrennt und simultan ablaufende Translokationswege von Anionen (grün) und Kationen (blau) im PorB_{W135}-Kanal (Kutzner *et al.*, 2011).

1.3.1.4 Einfluss vom PorB im bakteriellen Resistenzmechanismus

Antibiotika aus der Gruppe der β -Laktame stellen heutzutage die am häufigsten eingesetzten Agenzien zur Bekämpfung bakterieller Infektionen dar. Durch ihren übermäßigen Einsatz in den vergangenen Jahrzehnten wurde die Behandlung durch Entwicklung bakterieller Resistenzmechanismen schwieriger. Dabei zeigen pathogene Gattungen wie *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* und *Neisseria* immer neuere Resistenzen gegen antibakterielle Stoffe (Pagès *et al.*, 2008). Beispielsweise entwickelten die beiden pathogenen Arten N_{men} und N_{gon} vermehrt Resistenzen gegen Tetrazyklin und Penicillin, da diese Stoffe ursprünglich die primäre Therapie bildeten.

Dabei sind unter anderem folgende Faktoren für die bakterielle Resistenz verantwortlich: die Enzyminaktivierung durch Expression inhibitorischer Faktoren, Antibiotikaaustoss durch *multi drug efflux* (MDR)-Pumpen und die Einschränkung der Permeabilität der äußeren Membran. Die Durchlässigkeit der äußeren Membran kann dabei einerseits durch Herabregulierung Porin-kodierender Gene, andererseits durch die Mutation dieser Gene und somit ihrer Translationsprodukte modifiziert werden (Delcour, 2009). Zusammenfassend wird dadurch die Konzentration dieser toxischen Substanzen in der Zelle verringert.

Eine erhöhte Resistenz infolge von Mutationen in Porin-kodierenden Allelen konnte bereits einigen Porinen wie dem OmpF aus *E. coli* (Simonet *et al.*, 2000; Bredin *et al.*, 2002) oder PorB_{gon} (Olesky *et al.*, 2006, 2002) zugeordnet werden. Dabei zeigte der FA140-Stamm (natürlicher N_{gon} -Mutant) mit einer Mutation im PorB-kodierenden Gen, eine signifikant höhere Resistenz gegenüber den beiden Antibiotika Penicillin und Tetrazyklin (Gill *et al.*, 1998), wobei sich die betreffende Position (Gly120) im *loop 3* (L3) innerhalb der Porinengstelle befindet. Dieser Austausch, welcher der Position Gly103 in PorB_{men} entspricht, konnte durch Mutationsstudien als Ursache der verstärkten bakteriellen Resistenz identifiziert werden (Olesky *et al.*, 2002).

Im Zusammenhang mit der immer weiter zunehmenden Resistenz von N_{men} gegenüber Penicillin und Tetrazyklin könnte die Analyse eines möglichen Einflusses der Position 103 auf den Antibiotikatransport in PorB_{men} eine wichtige Rolle einnehmen und wird in dieser Arbeit behandelt.

1.3.2 OmpP2 aus *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae (*H. influenzae*) ist der bekannteste Vertreter aus einer Vielzahl verschiedener pathogener *Haemophilus*-Arten und ist zusammen mit *Streptococcus pneumoniae* und *N. meningitidis* der häufigste Auslöser bakterieller Meningitis, wobei auch akute Bronchitis, Lungenentzündung und Epiglottitis ausgelöst werden können. In Deutschland liegt die Inzidenz bei etwa 0,2 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern (RKI, 2011).

Generell wird *H. influenzae* in zwei Kategorien unterteilt, den typisierbaren und den untypisierbaren Serotypen (NTHi), welche über keine charakteristische Oberflächenkapsel verfügen. Während es eine Vielzahl unterschiedlicher NTHi-Typen gibt, konnten sechs typisierbare *H. influenzae*-Serotypen identifiziert werden (a-f), wobei Typ b (Hib) das mit Abstand schwerste Krankheitsbild verursacht und am häufigsten im Blut infizierter Personen diagnostiziert wird. Bei den meisten Stämmen handelt es sich um opportunistische Pathogene, die erst durch einen auslösenden Faktor (Virusinfektion, Allergie) Krankheitsbilder auslösen. Obwohl NTHi-Stämme dafür bekannt sind, hauptsächlich Ohr- und Augeninfektionen mit seltener Letalität auszulösen, werden etwa 400.000 Todesfälle weltweit auf den Hib-Stamm zurückgeführt. Ein Impfstoff gegen den gefährlichsten Serotypen Hib existiert bereits seit über 20 Jahren in Form von Polysaccharid-, Konjugat- und Kombinations-Impfstoffen und konnte vor allem die Zahl bakterieller Meningitis erheblich reduzieren (Atkinson *et al.*, 2006; Bar-On *et al.*, 2012).

Das Protein OmpP2 ist das am häufigsten vorkommende Porin der äußeren Membran von *H. influenzae* in Hib- und NTHi-Stämmen. Homologie-basierende Strukturmodelle (mit *K. pneumoniae* OmpK32 sowie *E. coli* PhoE und OmpF) vermuten für OmpP2 einen typischen, trimeren Aufbau (Abb. 1.7), mit 16 anti-parallelen β -Faltblattsträngen, acht langen, extrazellulären *loops* (L1-L8) und sieben kurzen periplasmatischen *turns*. Ähnlich zu anderen bekannten Porinstrukturen scheint L2 jedes einzelnen Monomers die trimere OmpP2-Porinstruktur zu stabilisieren (Srikumar *et al.*, 1992, 1997; Galdiero *et al.*, 2003). L3 bildet womöglich eine Helix und faltet in den Porinkanal, wodurch die porintypische Verengung (Konstriktion) verursacht werden könnte, welche Einfluss auf die Porenausschlussgröße, die physiologischen Eigenschaften sowie das *gating* haben kann. Außerdem wird vermutet, dass der am extrazellulären Kanalende lokalisierte L8 ebenfalls zum Teil in die Pore faltet und für die Porinfunktionalität wichtig ist (Galdiero *et al.*, 2006). Charakteristischerweise sind Transmembranbereiche von bekannten, homologen OmpP2-kodierenden Genen

weitestgehend konserviert, während die extrazellulären *loops* eine hohe Heterogenität aufweisen (Bell *et al.*, 1994).

OmpP2 hat die Funktion eines klassischen Diffusionsporins (Pullen *et al.*, 1995) und vermittelt bspw. den für das Überleben des Pathogens essentiellen Transport von Nikotinamid-Derivaten wie NAD (Nikotinamidadenindinukleotid), NMN (Nikotinamidmononukleotid) oder NR (Nikotinamidribosid), da *H. influenzae* über keine Enzyme zur *de novo*-Synthese dieser Co-Faktoren verfügt (Andersen *et al.*, 2003). Im Vergleich zu PorB scheint OmpP2 einen größeren Kanaldurchmesser mit einem molekularen Größenausschluss von 1400 Da anstatt 600 Da zu haben (Vachon *et al.*, 1985).

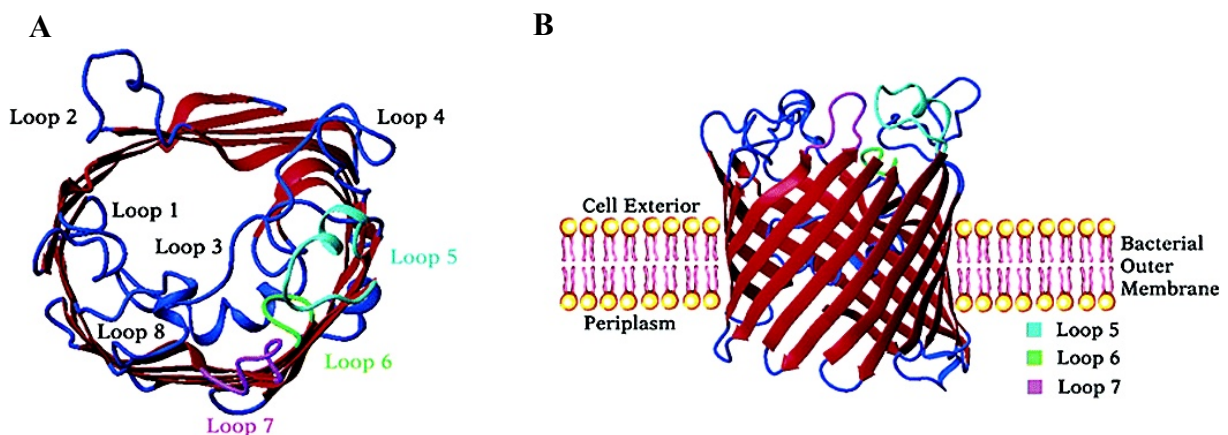


Abb. 1.7: Homologie-basierendes Strukturmodell eines OmpP2-Monomers aus *H. influenzae*. Gezeigt ist das Strukturmodell von OmpP2 von der (A) extrazellulären Seite und (B) Membranseite mit den *loops* 1-8 (Galdiero *et al.*, 2006).

OmpP2 nimmt eine wichtige Rolle in der Pathogenität, aber auch in der Invasivität von *H. influenzae* ein. Dies konnte gezeigt werden, indem spezifische OmpP2-Antikörper antibakteriell gegen Hib und NTHi-Typen wirkten, als auch einen schützenden Effekt in einem Bakteriämie-Rattenmodell bewirkten. Des Weiteren offenbarten *H. influenzae* OmpP2-Mutanten im Vergleich zu ihren Wildtyp-Proteinen eine signifikant reduzierte Pathogenität im Rattenmodell (Galdiero *et al.*, 2001, 2003; Murphy und Bartos, 1988; Duim *et al.*, 1996).

Weiterhin konnte eine OmpP2-induzierte Aktivierung der Entzündungsreaktionskaskade im Wirt identifiziert werden. Gereinigtes OmpP2, aber auch synthetische Peptide, welche den extrazellulären *loops* L5-L7 entsprachen, bewirkten in diesem Zusammenhang als Induktor die Induzierung der Signaltransduktionskaskade durch Zellphosphorylierung und Aktivierung wichtiger Faktoren (z.B. p38, mitogenaktivierte Proteinkinase) des MAP-Kinase-Weges (*mitogen-activated protein*, MAP). Demgegenüber waren synthetische, den β -Faltblättern der Transmembrandomänen entsprechenden Peptide dafür nicht in der Lage (Galdiero *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 1997). Als Reaktion auf die Entzündung erfolgte die Aktivierung weiterer

Kaskaden, wie die des JNK-Signalweges (C-Jun-N-terminale Kinasen) und einer daraus resultierenden Sekretion von Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) und des Tumornekrosefaktors (TNF- α). Generell scheint dabei L7 die größere Bedeutung gegenüber L5 und L6 als Induktor der Signalkaskade zu haben (Vitiello *et al.*, 2008). Wie bereits für das Porin PorB_{men} konnte auch für OmpP2 belegt werden, dass diese Aktivierung der Entzündungskaskade im Wirt das Resultat einer initialen Detektion von OmpP2 durch die Toll-like Rezeptoren und der Initiierung eines OmpP2-TLR-Komplexes ist. Dabei ist das Porin ein Ligand für den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) nicht aber für den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), wobei die weiterführende, intrazelluläre Signalweiterleitung eine MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*)-abhängige Transduktion darstellt (Galdiero *et al.*, 2004).

1.3.3 FomA aus *Fusobakterium nukleatum*

Fusobakterium nukleatum (*F. nukleatum*) ist ein sowohl bei Menschen als auch bei Tieren hauptsächlich im Rachenraum vorkommendes Bakterium und das am häufigsten präsente Bakterium im menschlichen Mund, als Hauptbestandteil von Zahnbelag. Die genaue pathogene Bedeutung ist noch nicht genau geklärt, da diese Art auch in gesunden Mundhöhlen nachgewiesen werden konnte (Suchett-Kaye *et al.*, 1999). *F. nukleatum* wird verdächtigt die Auslösung von Krankheiten wie Leberabszess, Arthritis aber auch Endokarditis zu beeinflussen (Bolstad *et al.*, 1996) und wurde ebenso im Zusammenhang mit Frühgeburten nachgewiesen. Dabei war das Bakterium im Fruchtwasser, Plazenta und Fruchtblase frühgebärender Frauen präsent (Han *et al.*, 2004, 2010). Darüber hinaus konnte diesem Bakterium ebenfalls ein Zusammenhang mit Darmkrebs zugeordnet werden, mit dem Resultat einer Wachstumsverstärkung bei einem bereits präsenten Tumor (Kostic *et al.*, 2013).

FomA ist Hauptbestandteil der äußeren Membran in *F. nukleatum* und zeigt typische Diffusionseigenschaften eines trimeren Porins (Kleivdal *et al.*, 1995, 1999) mit dem Transport von Arabinose, Maltotriose (Takada *et al.*, 1988; Kleivdal *et al.*, 1995) und den β -Laktamen Cepharylidin und Cefsulodin (Punternvoll *et al.*, 2000), obwohl nur eine geringe Sequenzhomologie zu anderen Porinen besteht (Bolstad *et al.*, 1994; Bakken *et al.*, 1989). Die charakteristische Diffusionseigenschaft konnte auch durch das existente *gating* in FomA bestätigt werden (Kleivdal *et al.*, 1995, 1999; Punternvoll *et al.*, 2002).

Strukturvorhersagen anhand von Topologiemodellen der FomA-Konformation sind kontrovers, deuten aber auf eine 16-strängige (Kleivdal *et al.*, 2001) β -barrel Fassstruktur mit insgesamt acht *loop*-Elementen hin (Abb. 1.8). Eine oberflächenexponierte Lage von L1, L3-L5 und L7 wurde diskutiert. Die porintypische Engstelle im Kanal, welche häufig von L3 (z.B. OmpF oder PorB) gebildet wird, ist hier wahrscheinlich untypisch durch L6 definiert (Puntervoll *et al.*, 2000, 2002; Kleivdal *et al.*, 2001; Bolstad *et al.*, 1994).

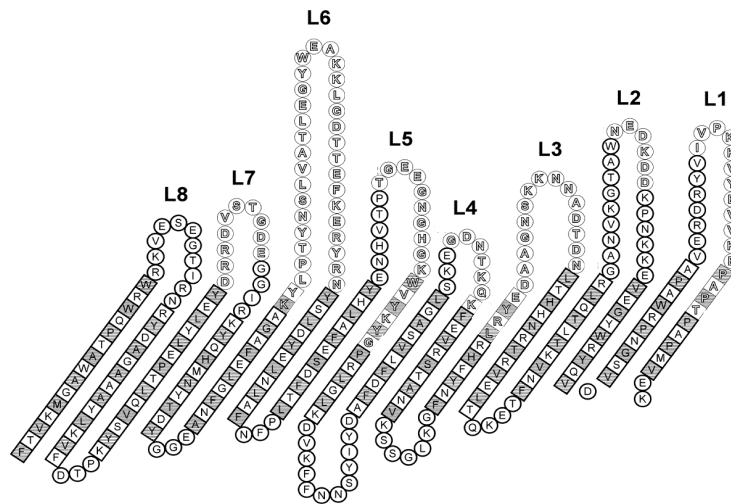


Abb. 1.8: Vermutetes FomA-Topologiemodell. Die Darstellung zeigt die Aminosäuresequenz des Porins mit vorhergesagten 16 β -Faltblattstrukturelementen (Kästchen) und acht *loop*-Domänen (Kreise). Grau hervorgehobene Kästchen zeigen Aminosäurereste, welche der hydrophoben Membranumgebung zugewandt sind, während die weißen Kästchen Reste darstellen, die in den Kanal orientiert sind. Die acht theoretischen, extrazellulären *loop*-Bereiche sind von L1-L8 dargestellt (nach Kleivdal *et al.*, 2001).

L2 und L8 sind somit die einzigen Domänen für welche keine experimentellen Daten vorliegen (Puntervoll *et al.*, 2000), könnten aber Funktionen in der Ausbildung der trimeren FomA-Struktur haben.

FomA zeigte immunogene Eigenschaften, indem es mitogen auf B-Zellen wirkte und eine polyklonale B-Zellaktivierung in Mausmakrophagen sowie eine Migrationssteigerung von humanen Monozyten induzierte (Takada *et al.*, 1988). Darüber hinaus konnte FomA ebenfalls als direkter Ligand für den Toll-like Rezeptor 2, nicht aber für den Toll-like Rezeptor 4, identifiziert werden. Erfolgt die Aktivierung der TLR2-abhängigen Immunantwort durch die Bindung von FomA, wird die Sekretion von IL-8 und NF- κ B in HEK-Zellen ausgelöst. Gleichzeitig werden vermehrt Oberflächenmoleküle wie CD86 (*cluster of differentiation* 86) oder MHCII-Komplexe (*major histocompatibility complex*, MHC) auf B-Zellen von Mäusen gebildet. Auch die FomA-abhängige Bildung von spezifischen Antikörpern wurde einer TLR2-abhängigen Immunantwort zugeordnet (Toussi *et al.*, 2012a).

1.4 Die Rolle der *Neisseria*-Porine in der humoralen Immunantwort

Neben den für die bakterielle Adhärenz wichtigen Pili- und Opa-Proteinen (Rudel *et al.*, 1992; Makino *et al.*, 1991), wird auch PorB selbst eine bedeutende Rolle beim Eintritt von *Neisseria* in die Wirtszelle zugeschrieben, indem es im Verlauf der Invasion Einfluss auf die Induktion einer Aktinreorganisation im Wirt ausübt. PorB bindet bei diesem Vorgang direkt an das Aktinzytoskelett in infizierten Zellen und ruft auf diese Weise die Aktinpolymerisation von F-Aktin ähnlichen Filamenten hervor, welche in Folge dessen die Adhäsion des Pathogens um die infizierte Zelle verstärken (Wen *et al.*, 2000).

Während die PorB-Porine der Serogruppen IA (PIA) und IB (PIB) in N_{gon} vorkommen, verfügt N_{men} zusätzlich zu den verschiedenen Serogruppen des Porins PorB auch über das Porin PorA (Lytton und Blake, 1986). In N_{men} sind sowohl PorB als auch PorA an der bakteriellen Pathogenität beteiligt. PorB bindet dabei direkt an das Mannose-bindende Lektin (MBL), während PorA mit dem C4-Bindeprotein (C4BP) des Komplementsystems interagiert und auf diese Weise komplementaktivierende Funktionen gehemmt werden (Estabrook *et al.*, 2004; Jarva *et al.*, 2005). Auch von $PorB_{gon}$ sind inhibierende Effekte auf das Komplementsystem durch die Bindung an Faktor H und Komplexierung mit C4BP bereits bekannt (Ram *et al.*, 1998, 1999, 2001). $PorB_{men}$ hat als Mitogen einen potentiellen Einfluss auf Zellen des menschlichen und tierischen Immunsystems, wie Makrophagen und Dendritische Zellen (MacLeod *et al.*, 2008). Dabei kann dieses Porin B-Zellen sowie Dendritische Zellen stimulieren, indem es die Aktivierung und Proliferation der MHCI- und MHCII-Komplexe als auch der CD86-, CD40- und CD69-Moleküle (nicht jedoch CD80) induziert (Wetzler *et al.*, 1996; Massari *et al.*, 2002, 2003; Platt *et al.*, 2013). Diese PorB-aktivierten Zellen (Abb. 1.9) bewirken im weiteren Verlauf die Stimulation von T-Zellen und somit die IL-6- als auch TNF- α -Sekretion (Singleton *et al.*, 2005; Snapper *et al.*, 1997), welche MAP-Kinase-abhängige Reaktionen darstellen (Platt *et al.*, 2013).

Bei diesen Porin-induzierten, stimulatorischen Effekten auf das Immunsystem handelt es sich um Toll-*like* Rezeptor 2-, nicht aber Toll-*like* Rezeptor 4-abhängige Reaktionen, die eine spezifische PorB-TLR2-Komplexierung voraussetzen. Die nachfolgende, intrazelluläre Signalweiterleitung, welche in der Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B resultiert, setzt wiederum die Bindung des intrazellulären Adaptorproteins MyD88 an den zytosolischen Bereich des Komplexes voraus (Massari *et al.*, 2002, 2003).

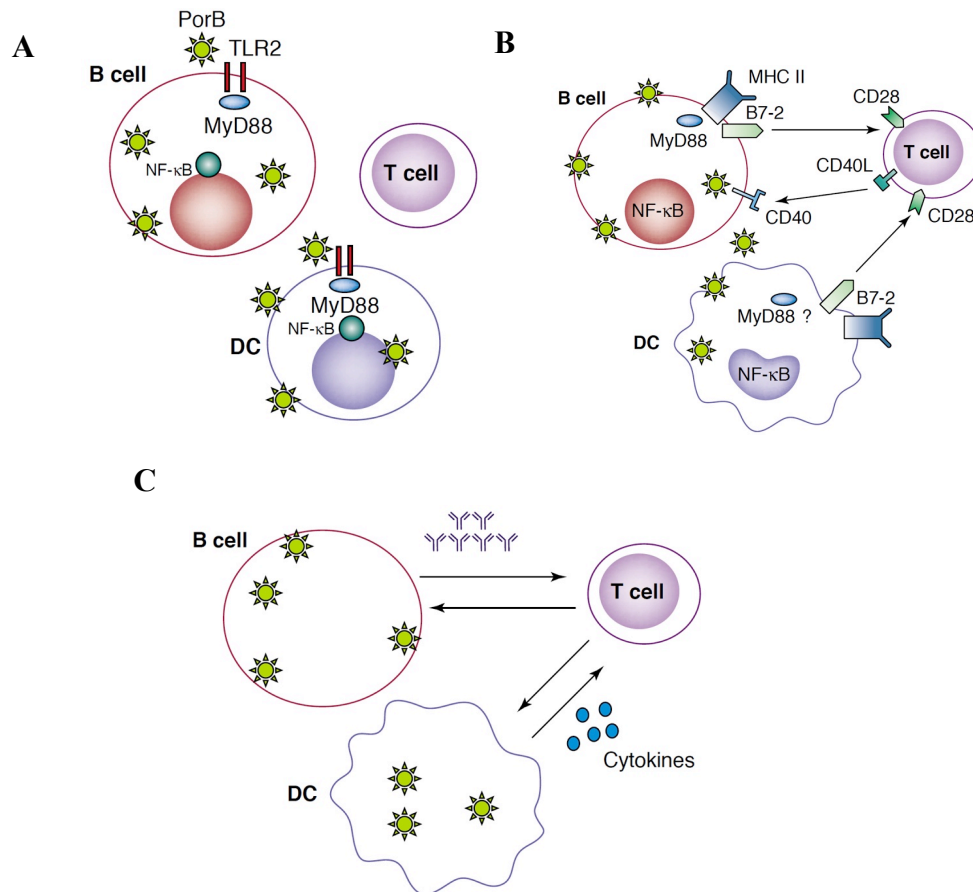


Abb. 1.9: Ablauf der Immunzellen-Aktivierung durch PorB_{men} . (A) PorB_{men} induziert die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in antigenpräsentierenden B-Zellen (*B cell*) und Dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC). (B) Neben der Aktivierung der Proliferation von antigenpräsentierenden Zellen, induzieren PorB-Moleküle zusätzlich die Vermehrung der co-stimulierenden Moleküle B7-2 (CD86) und CD40, wie auch des MHCII-Komplexes auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen. Die Erkennung und Komplexierung der PorB-Moleküle und die daraus resultierende Induktion dieser immunspezifischen Prozesse sind abhängig von der Exposition des Toll-like Rezeptors 2 (TLR2) auf antigenpräsentierenden Zellen. Die Weiterleitung der intrazellulären Signalkaskade ist dabei eine MyD88-abhängige Reaktion. (C) Die vermehrte Expression des B7-2 (CD86) als auch die Interaktion mit seinem T-Zellen-Ligand CD28 erhöht zusätzlich die Interaktion und Proliferation von antigenpräsentierenden T-Zellen, sowie die Sekretion von Zytokinen und spezifischen PorB-IgG-Antikörpern durch antigenpräsentierende Zellen (Massari *et al.*, 2003).

Obwohl die Auslösung der Immunantwort grundsätzlich einen PorB-TLR2-Komplex voraussetzt, scheint die Induktion der Signalkaskade über einen heterologen PorB-TLR2-TLR1-Komplex zusätzlich verstärkt zu werden. Dieser Komplex konnte im Vergleich zu einem TLR2-TLR2-Homodimer oder TLR2-TLR6-Heterodimer eine signifikant höhere IL-8-Expression induzieren (Massari *et al.*, 2006). Dabei ist nicht bekannt, ob TLR1 als PorB-Ligand direkt an der Bindung beteiligt ist oder einen möglichen Einfluss auf einen bereits erfolgten PorB-TLR2-Komplex ausübt.

Als Mitogen zeigt PorB ausgeprägte Adjuvanzeigenschaften und induziert eine viel stärkere humorale Immunantwort im Vergleich zu Immunsystem-aktiverenden bakteriellen kapsulären Polysacchariden, bakteriellen Oligosacchariden oder dem Antigen Ovalbumin (OVA) (Mackinnon *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2008b). Versuche mit OVA-immunisierten Mäusen zeigten eine zehnfache Verstärkung der Produktion von IgG, im Falle einer simultanen OVA-PorB-Injektion. Mit TLR2-*knock-out*-Mäusen konnte bewiesen werden, dass diese Adjuvanzwirkung TLR2-abhängigen Reaktionen zugrunde liegt (Singleton *et al.*, 2005; Platt *et al.*, 2013).

Bakterien die im Menschen keine systemischen Infektionen hervorrufen, bezeichnet man als kommensal. Die kommensale *Neisseria lactamica* (*N. lactamica*, N_{lac}) ruft im Gegensatz zu N_{men} und N_{gon} keine systemischen Infektionen hervor, kommt aber häufig im menschlichen Nasen-Rachen-Raum vor (Hollis *et al.*, 1969). Die Erkennung von PorB aus *N. lactamica* (PorB_{lac}) ruft zwar gleichermaßen eine TLR2-abhängige Immunantwort aus, dies aber mit einer geringeren Intensität. Beispielsweise erfolgt eine schwächere Induktion der IL-8-, IL-6-, TNF- α - und TLR2-Produktion, die anschließend wieder schnell abnimmt. Obwohl ein mitogener Effekt von N_{lac} auf B-Zellen gezeigt werden konnte, fällt dieser im Vergleich zu den beiden pathogenen *Neisseria*-Gattungen schwächer aus (Vaughan *et al.*, 2010).

PorB_{lac} hat *in vitro* eine schwächere Affinität zum TLR2 als das homologe PorB_{men} (K_D -Wert: 20 nM im Vergleich zu 10 nM, berechnet anhand von ELISA-Daten), was mit einem unterschiedlichen Bindungsmuster an TLR2 erklärt werden könnte. Als Ursache dafür wurde die unterschiedliche Aminosäuresequenz innerhalb der *loop*-Bereiche diskutiert, welche möglicherweise im Vergleich zu PorB_{men} eine differente elektrostatische Ladung induziert, die wiederum unterschiedliche Auswirkungen auf die TLR2-Bindung haben könnte (Liu *et al.*, 2010).

Untersuchungen mit PorB_{men}-Serogruppe B (PorB_B) *loop*-Varianten (Abb. 1.10), die nach durchgeführter Mutation in den *loops* 4, 5 und 7 Teile der Aminosäuresequenz der *loop*-Regionen aus PorB_{lac} enthielten, induzierten im Vergleich zum PorB_B-Wildtyp eine durchgehend schwächere Immunantwort mit niedrigeren IL-8-Expressionsraten (Toussi *et al.*, 2012b). Inwieweit diese Mutationen Einfluss auf die TLR-Bindung haben, wird in dieser Arbeit durch einen Strukturvergleich des PorB-Wildtyps (PorB_B) und der Mutanten näher charakterisiert.

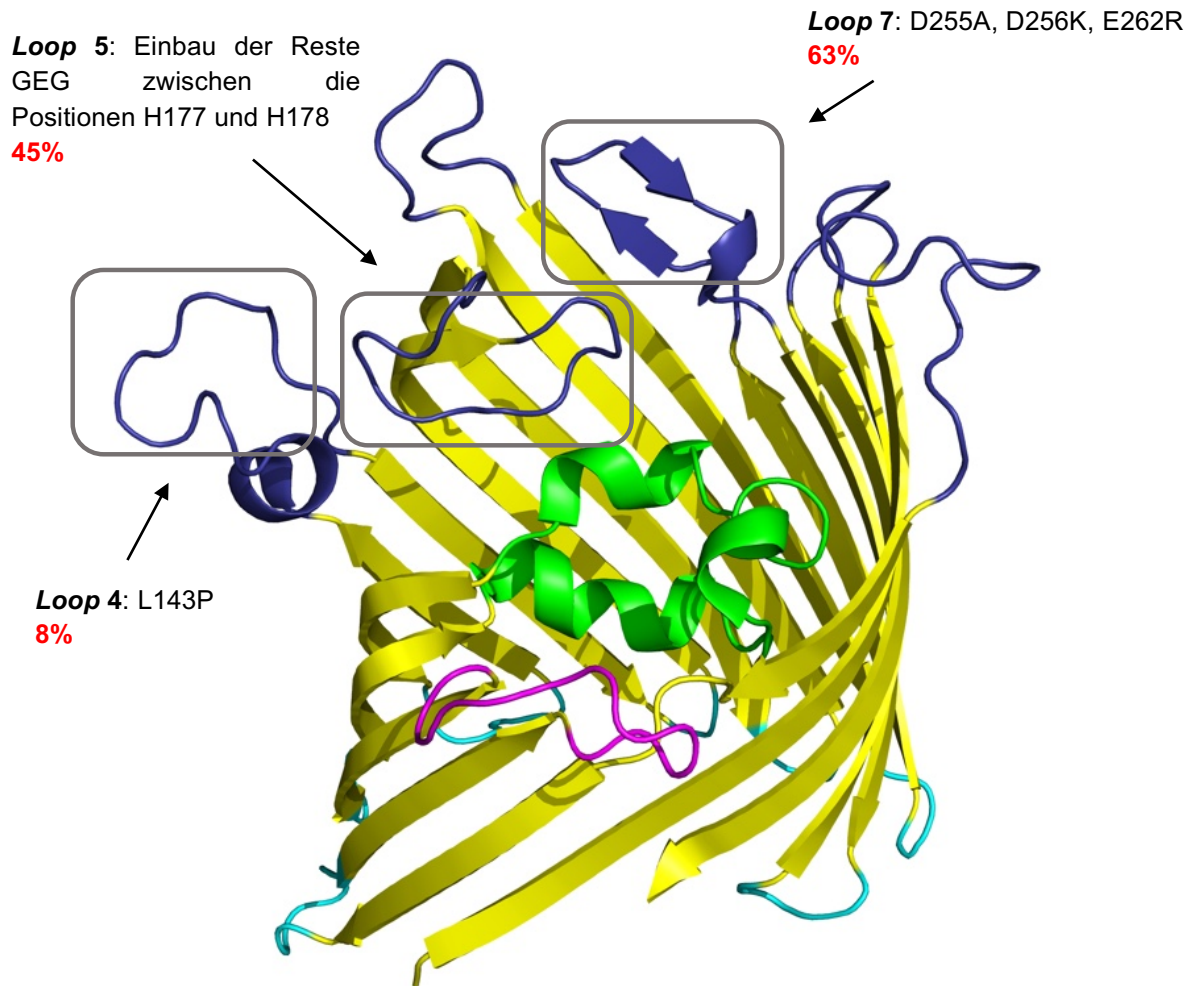


Abb. 1.10: Por_B-Varianten aus *N. meningitidis* induzieren eine unterschiedlich starke Immunantwort. TLR2-HEK-Zellen wurden mit dem Wildtyp PorB der Serogruppe B (Por_B) und mit jeweils drei unterschiedlichen Por_B *loop*-Mutanten (PorB^{GEG}, PorB^{DDE255-262AKR}, PorB^{L143P}) über 18 Stunden inkubiert und die IL-8-Sekretion in Zellüberständen durch ELISA detektiert. Die Positionen der drei Mutationen sind exemplarisch anhand der Struktur von PorB_{W135} (3A2R, Tanabe *et al.*, 2010) dargestellt. Dabei zeigten die drei Por_B-Mutanten eine verringerte IL-8-Sekretion im Vergleich zum Wildtyp (PorB^{GEG} 45%, PorB^{DDE255-262AKR} 63%, PorB^{L143P} 8%) (Toussi *et al.*, 2012b).

1.5. Zielstellung der Arbeit

Porine der äußeren Membran gramnegativer Bakterien weisen als Adjuvanz und PAMP eine potentielle Wirkung als Immunogen auf. Dabei löst die Detektion und Bindung des Porins PorB durch spezifische Oberflächenrezeptoren von Abwehrzellen des Wirtes die angeborene Immunantwort aus. Dies erfolgt durch sogenannte Toll-*like* Rezeptoren (TLR), die als PRRs spezifische Rezeptoren für die Porine darstellen und ihr Komplex mit PorB die zelluläre Signaltransduktion initiiert. Obwohl die Auswirkungen des PorB-TLR-Komplexes bereits gut beschrieben sind, fehlen wichtige strukturelle Daten, um den Mechanismus dieser Bindung bis zur atomaren Auflösung zu verstehen, sowie ihre funktionellen Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* besser beschreiben zu können.

Um ein komplettes Bild der strukturellen Porineigenschaften zu erhalten, sind neben der Beschreibung ihrer immunogenen Effekte, auch Untersuchungen des Ionentransportes (Einfluss auf das zelluläre Apoptoseverhalten des Wirtes) und der Antibiotikatranslokation (Charakterisierung bakterieller Resistenzmechanismen) notwendig.

Strukturanalysen und –vergleiche zwischen dem Wildtyp der PorB-Serogruppe B (PorB_B) und der PorB-Serogruppe B-AKR-Variante (PorB_{AKR}), welche in Mutationsstudien den stärksten Verlust der immunogenen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp aufwies, sollten Hinweise auf den PorB-TLR2-Reaktionsmechanismus und die daran potentiell beteiligten Porinstrukturbereiche geben.

Zusätzlich sollten weitere funktionelle Eigenschaften des PorB im Zusammenhang mit dem Antibiotika- und dem Zuckertransport näher beschrieben werden, wobei auch auf die spannungsabhängige Kanalöffnung und –schließung (*gating*) eingegangen werden sollte.

Darüber hinaus war das Ziel dieser Arbeit, weitere bekannte Liganden (OmpP2 und FomA) des TLR2-Rezeptors zu exprimieren, zu reinigen und ihre Struktur dreidimensional aufzulösen, um dadurch ihre funktionellen Eigenschaften näher beschreiben zu können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Technische Geräte

Gerät	Firma
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Galaxy Ministar Tischzentrifuge	VWR
LAS-4000 <i>gel-imaging-system</i>	Fujifilm
2510 Ultraschallbad	Branson
Transilluminator Bio View UST-15M-8K	Biostep
ÄktaPurifier	GE Healthcare
TissueLyser-II Kugelmühle	Qiagen
M205C Mikroskop	Leica
CrystaLight 100	Molecular Dimensions
Zetasizer Nano-S	Malvern
Infinite M200 Pro Absorptionsphotometer	Tecan
NanoITC 2G	TA Instruments
Zentrifuge 5804R	Eppendorf
Digital Heizblock	VWR
Mighty Small II SDS-Gel Laufkammer	Hoefer Inc.
TypMini Agarose-Laufkammer	NeoLab
EV202 / EV 231 Spannungsapparatur	Consort
Polymax 1040 Plattformschüttler	Heidolph
J-810 CD-Spektropolarimeter	Jasco
Horibo Fluoreszenzspektrometer	Instruments S.A., Inc.
BioRad	Gene pulser
Hei-VAP Rotationsverdampfer	Heidolph
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
C1000 PCR <i>thermal-cycler</i>	BioRad
pH Meter 766 Calimatic	Knick
RCT Rührer	IKA
Avanti J-30I Zentrifuge	Beckmann Coulter

2.1.2 Chemikalien

Standardchemikalien wurden in dieser Arbeit, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich oder Merck bezogen. Verwendete Detergenzien stammen von der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA), eingesetzte Lipide von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA).

2.1.3 Standards, Enzyme und Kits

100 bp DNA-Molekulargewichtsstandard	New England-Biolabs
1 kb DNA-Molekulargewichtsstandard	New England-Biolabs
Kristallisations-Screening-Kits	Molecular Dimensions, Emerald Biosystems, Jena Bioscience
GeneJET Plasmid Mini-/Midiprep Kit	Thermo Scientific
peqGOLD Cycle-Pure Kit	peqlab
peqGOLD Gel-Extraction Kit	peqlab
PageRuler Prestained Molekulargewichtsstandard	Thermo Scientific
BenchMark™ Fluorescent Protein Standard	Life Technologies
BenchMark™ His-tagged Protein Standard	Life Technologies
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs
Enterokinase	New England Biolabs
FastAP thermosensitive alkalische Phosphatase	Thermo Scientific
Platinum PCR-SuperMix High Fidelity	Life Technologies

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Thermo Scientific und New England Biolabs bezogen und mit den entsprechenden, mitgelieferten Puffern nach Protokoll verwendet.

2.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert und sind im Anhang A.1 gelistet.

2.1.5 Nährmedien

LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 1% w/v Agar-Agar
-URA-Agar	2 g/l <i>yeast synthetic drop-out</i> -Medium ohne Uracil, 6,7 g/l <i>yeast nitrogen base</i> ohne Aminosäuren, 2% (w/v) Glukose, 20 g/l Agar-Agar
YPD-Medium	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 20 g/l Glukose
YPD-Agar	YPD-Medium, 20 g/l Agar-Agar

2.1.6 Stämme und Plasmide

<i>E. coli</i> Top10	F-, <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr- hsdRMS- mcrBBC)$, $\Phi80lacZ$ $\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)$ 7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (StrR), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- $\Delta porin$	Locher und Rosenbusch, 1997
<i>Pichia pastoris</i> X-33	Wildtyp
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FGY217	MATa, <i>ura3-52</i> , <i>lys2</i> Δ 201, <i>pep4</i> Δ

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen und Mutagenesereaktionen wurden die folgenden Plasmide verwendet (aufgeführt mit den Restriktionsschnittstellen sowie der Plasmidherkunft).

Protein	Plasmid	Klonierung	
PorB _{W135} -Wildtyp	pET21b	<i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I	Freundlicherweise von Mikio Tanabe (Universität Halle, ZIK HALOmem) zur Verfügung gestellt
PorB _{W135} -Mutanten	pET21b	<i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I	Durch Mutagenese-PCR generiert
PorB _B	pET24a	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	Freundlicherweise von Paola Massari (Universität Boston, <i>School of Medicine</i>) zur Verfügung gestellt
PorB _{AKR}	pET24a	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	
FomA	pET11c	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	
OmpP2	pET21a	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	Generiert aus cDNA-Bank, Stamm Rd [KW20]

Alle verwendeten Genkonstrukte sind nachfolgend angegeben.

Konstrukt	Plasmid	Ursprungsorganismus	Expressionsorganismus
PorB _{W135} Wildtyp	pET21b	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
PorB _{W135} G103D	pET21b	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
PorB _{W135} G103K	pET21b	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
PorB _{W135} G103K_D104K	pET21b	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
PorB _{W135} G101K	pET21b	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
PorB _{W135} G103E	pET21b	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
PorB _{W135} G103R	pET21b	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
PorB _{W135} G103H	pET21b	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
PorB _{W135} G103F	pET21b	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
PorB _{W135} G103M	pET21b	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
OmpP2	pET21a	<i>H. influenzae</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
PorB _B	pET24a	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
PorB _{AKR}	pET24a	<i>N. meningitidis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
FomA	pET11c	<i>F. nukleatum</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)- Δ porin
sTLR2VLRB	pPICZ α B	<i>Homo sapiens</i>	<i>P. pastoris</i> X-33
sTLR2_GFP	pDDGFP2	<i>Homo sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i> FGY217
sTLR2VLRB_GFP	pDDGFP2	<i>Homo sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i> FGY217
MBP_sTLR2VLRB_GFP	pDDGFP2	<i>Homo sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i> FGY217
sTLR2Fc		<i>Homo sapiens</i>	HEK293

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung und Klonierung der unterschiedlichen Gensequenzen wurden die im Anhang aufgelisteten Oligonukleotide verwendet (A.1). Diese beinhalteten neben der zum Gen komplementären Sequenz, zusätzliche Überhänge zur Generierung der spezifischen Erkennungsstelle für die Restriktionsendonukleasen. Die codierenden Sequenzen wurden dabei entweder aus bereits vorhandenen Plasmiden oder aus cDNA-Bibliotheken der entsprechenden Organismen amplifiziert.

5x HF-Puffer	10 μ l	PCR-Programm		
10 μ M vorwärts-Primer	2,5 μ l	98°C	1 min	30 Zyklen
10 μ M rückwärts-Primer	2,5 μ l	98°C	30 s	
10 mM dNTPs	1 μ l	55°C	30 s	
ddH ₂ O	32,5 μ l	72°C	20 s / kb	
<i>template</i> -DNA (40 ng)	1 μ l	72°C	5 min	
Phusion-DNA-Polymerase	0,5 μ l (1 U)			
Gesamtvolumen	50 μ l			

Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur schnellen Überprüfung von Plasmiden auf enthaltenes Insert verwendet. Dafür wurde pro Ansatz 10 μ l des Platinum PCR Supermix *High Fidelity* Gemisches mit je 2 μ M des entsprechenden vorwärts- und rückwärts-Primers versetzt. Anschließend wurde je ein Klon von der Platte gepickt, in den Ansatz überführt und mit folgendem Programm amplifiziert.

94°C	2 min	
94°C	30 s	30 Zyklen
55°C	30 s	
68°C	60 s / kb	

Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese diente der Generierung von Punktmutationen innerhalb des PorB_{W135}-kodierenden Gens. Die Durchführung erfolgte nach der QuikChange[®]-Methode (Stratagene) und den im Anhang aufgeführten Primern (A.1).

5x HF-Puffer	10 μ l	PCR-Programm		
10 μ M vorwärts-Primer	2,5 μ l	98°C	1 min	16 Zyklen
10 μ M rückwärts-Primer	2,5 μ l	98°C	30 s	
10 mM dNTPs	1 μ l	55°C	30 s	
ddH ₂ O	32,5 μ l	72°C	30 s / kb	
<i>template</i> -DNA (40 ng)	1 μ l	72°C	10 min	
Phusion-DNA-Polymerase	0,5 μ l (1 U)			
Gesamtvolumen	50 μ l			

Für den anschließenden Verdau der maternalen *template*-DNA wurde dem Ansatz 1 μ l des Enzyms *DpnI* zugeführt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Ligation

Der Restriktionsverdau des durch PCR amplifizierten DNA-Produkts (2.2.1) als auch des Plasmids erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben für mindestens eine Stunde. Um eine Re-Ligierung des Plasmids während der Ligationsreaktion zu verhindern, wurde dieser Ansatz mit einer alkalischen Phosphatase (Thermo Scientific) nach Herstellerprotokoll inkubiert. Der verdaute Plasmidansatz und das PCR-Produkt wurden gereinigt (peqGOLD Cycle-Pure Kit, peqlab) und ihre Konzentrationen anschließend bei 260 nm photometrisch bestimmt (Infinite M200 Pro, TECAN). Dabei diente folgende Formel zur Berechnung der DNA-Konzentration:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 50$$

Als Ligationsansatz wurde ein molares Verhältnis von 4:1 zwischen DNA-Produkt und Plasmid gewählt. Der Ansatz bestand aus 40 ng DNA-Produkt, 10 ng Plasmid, 1 μ l T4-Ligase-Puffer (10x) und 1 μ l T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific) und wurde mit sterilem dest. Wasser auf ein Endvolumen von 10 μ l aufgefüllt. Die Ligationsreaktion erfolgte bei 16°C über Nacht. Kompetente *E. coli* TOP10-Zellen wurden danach mit dem gesamten Ansatz (10 μ l) transformiert.

2.2.3 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

2.2.3.1 Kompetente *Escherichia coli*

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine Einzelkolonie TOP10 oder BL21 (*DE3*)-*Aporin* in 5 ml LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Danach wurden die Zellen des 5 ml-Ansatzes auf 3-4 Reaktionsgefäße aufgeteilt, pelletiert, in 50 µl einer 75 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für eine Minute auf Eis inkubiert. Diese chemokompetenten Zellen wurden bei jeder Transformation frisch hergestellt und sofort verwendet. Die chemokompetenten *E. coli*-Zellen wurden mit 10 µl Ligationsansatz (2.2.2) oder 1 µl Plasmid-DNA (ca. 20-50 ng) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 s, wurden die Zellen sofort auf Eis für 5 min inkubiert und anschließend mit 500 µl LB-Medium versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30-45 min bei 37°C und 500 U/min (*contact*-Thermomixer, Eppendorf) und das Ausplattieren von 40-100 µl Volumina auf antibiotikaselektiven LB-Agar-Platten.

2.2.3.2 Kompetente *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Herstellung von chemokompetenten *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen (*S. cerevisiae*) wurden 5 ml YPD-Medium mit einer Kolonie des Stammes FGY217 angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Mit diesem Ansatz wurden am nächsten Tag 50 ml YPD-Medium in einem 250 ml-Schüttelkolben auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 weiter inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 3.000 x g für 5 min abzentrifugiert, das Pellet in 25 ml sterilem Wasser resuspendiert und für 5 min bei 3.000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen, bei 8.000 x g für 15 s pelletiert und anschließend in 400 µl Lithiumacetat resuspendiert.

Die Transformation erfolgte durch das Zusammenpipettieren von 50 µl Zellsuspension, 240 µl 50% (w/v) PEG 3350, 25 µl (2 mg/ml) *carrier*-DNA (*salmon sperm*-DNA, Life Technologies), 3 µl (25 ng/µl) mit *Sma*I verdautem pDDGFP2-Vektor, 5 µl (150 ng/µl) amplifiziertem PCR-Produkt und 42 µl sterilem Wasser. Der Ansatz wurde kurz gemischt und danach zuerst für 30 min bei 30°C und anschließend für 25 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 8.000 x g für 15 s abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl sterilem dest. Wasser aufgenommen. Es wurden 10-200 µl Zellen auf selektiven -URA-Platten ausplattiert.

2.2.3.3 Kompetente *Pichia pastoris*

Zur Anzucht elektrokompenter *Pichia pastoris*-Zellen (*P. pastoris*) wurden 10 ml YPD-Medium mit einer Kolonie des Stammes X-33 versetzt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Mit dieser Kultur wurden anschließend 400 ml YPD-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 – 1,2 bei 30°C weiter inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurden die Zellen bei 1.500 x g für 5 min pelletiert, in neues YPD-Medium (versetzt mit 20 mM HEPES pH 7,5, 25 mM DTT) resuspendiert und für 15 min bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Es folgten Waschschrte mit kontinuierlich abnehmendem Volumen eiskaltem Wasser von 500 ml auf 50 ml und von 20 ml auf 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol. Die hergestellten elektrokompenten Zellen wurden im Anschluss auf Eis gehalten. Die Transformation erfolgte durch das Mischen von 80 µl der zuvor hergestellten kompetenten X-33-Zellen, 7 µl (1,5 mg/ml) mit *PmeI* linearisiertem pPICZαB-Expressionskonstrukt und 1,5 µl (10 mg/ml) *carrier*-DNA (*salmon sperm*-DNA, Life Technologies). Der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm *electrode gap*, peqlab) überführt und die Elektroporation mit einem *gene pulser* (BioRad) bei 1500 V, 25 µF und 200 Ω durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort mit 1 ml 1 M Sorbitol versetzt und 3 min auf Eis gehalten. Diese wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, 1 Stunde bei 30°C ohne Schütteln inkubiert, mit 2,5 ml YPD-Medium versetzt und eine weitere Stunde unter Schütteln bei 30°C gehalten. Die Zellen wurden pelletiert, in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert und mit Volumina von 10, 50 und 140 µl auf selektiven YPD-Platten mit 100 µg/ml Zeocin ausplattiert.

2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurde mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit isoliert. Dafür wurde eine 4 ml-Flüssigkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum und einer Einzelkolonie von der LB-Agar-Platte versetzt und für 14-18 Stunden bei 37°C unter Schütteln angezogen. Die Zellen wurden bei 14.000 x g für 5 min pelletiert und nach Herstellerangaben bearbeitet. Die Präparation beruht dabei auf der alkalischen Lyse der Zellen, einer Fällung chromosomaler DNA und der Reinigung der Plasmid-DNA über eine Ionenaustausch-Chromatographie.

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit dem GeneJET Plasmid Midiprep Kit gereinigt. Dafür wurde eine 40 ml Flüssigkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 14-18 Stunden bei 37°C unter Schütteln und die Präparation der DNA nach Herstellerangaben.

2.2.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Produkten wurde von der Firma GATC durchgeführt.

2.2.6 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Fragmenten verwendet. Dafür wurde 0,8% Agarose in 50 ml 1x TAE-Puffer aufgenommen und aufgeköcht. Nach kurzer Abkühlung wurde die Lösung mit 1x SYBR Safe DNA Gel stain (Life Technologies) versetzt und in einer Horizontal-Elektrophoresekammer (TypMini, NeoLab) polymerisiert. DNA-Proben wurden im Verhältnis von 3:1 mit 3x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung wurde bei 100 V, 500 mA und 100 W über einen Zeitraum von 20-80 min durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels SYBR-Fluoreszenz im UV-Bereich.

1x TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl pH 8,3, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA
3x DNA-Probenpuffer	50% (w/v) Glycerin, 0,25% (v/v) Bromphenolblau in 1x TAE

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption der Proteinlösung bei 280 nm mit einem Spektrophotometer (Infinite M200 Pro, TECAN) und einer Quarzküvette mit 10 mm Schichtdicke bestimmt. Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden anhand der Aminosäuresequenz durch das Programm ProtParam (Gasteiger *et al*, 2005) bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit folgender Formel (Gleichung 2.1).

$$c \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \frac{E_{280\text{nm}} [\text{AU}]}{\epsilon_{0,1\%,280\text{nm}} \left[\frac{\text{mL}}{\text{mg} \cdot \text{cm}} \right] \cdot d [\text{cm}]} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Die verwendeten Proteine sind mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichten nachfolgend aufgelistet.

Protein	ϵ [ml/mg·cm]	Molekulargewicht [Da]
PorB _{W135} Wildtyp	1,332	36663,6
PorB _{W135} G103D	1,329	36721,7
PorB _{W135} G103K	1,329	36734,7
PorB _{W135} G103K_D104K	1,329	36747,8
PorB _{W135} G101K	1,331	36676,7
PorB _{W135} G103E	1,329	36735,7
PorB _{W135} G103H	1,329	36743,7
PorB _{W135} G103R	1,328	36762,8
PorB _{W135} G103M	1,329	36737,8
PorB _{W135} G103F	1,328	36753,7
OmpP2	0,911	37604,7
PorB _B	1,313	33786,2
PorB _{AKR}	1,313	33782,4
FomA	1,920	42314,3
sTLR2_GFP	0,700	83401,0
sTLR2VLRB_GFP	0,840	91261,9
MBP_sTLR2VLRB_GFP	1,046	136632,4
sTLR2Fc	0,927	92832,2

2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit 5x Probenpuffer verdünnt, für 10 min bei 95°C inkubiert und mittels Tris-Glyzin-Gelen (Laemmli, 1970) mit 25 mA pro Gel für 40-50 min aufgetrennt.

5x Probenpuffer	200 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 2% β -Mercaptoethanol
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl pH 8,9, 19,2 mM Glyzin, 0,01% SDS
Färbelösung	0,05% (w/v) Brillant-Blau R-250, 25% (w/v) Isopropanol, 10% (w/v) Essigsäure
Entfärbelösung	10% (w/v) Essigsäure

	10 % Trenngel	12 % Trenngel	7,5 % Sammelgel
Rotiphorese NF Acrylamid / Bis-Lösung	1,33 ml	1,6 ml	440 μ l
1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS	1 ml	1 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS	-	-	400 μ l
ddH ₂ O	1,68 ml	1,4 ml	1,2 ml
Tetramethylethylendiamid	2 μ l	2 μ l	1,5 μ l
10% (w/v) APS	30 μ l	30 μ l	25 μ l

Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte entweder durch Coomassie-Brillant-Blau, bei welcher das Gel für 30 min zuerst in der Färbelösung inkubiert und anschließend bis zur gewünschten Bandenstärke entfärbt wurde oder durch Silberfärbung (Nesterenko *et al.*, 1994).

2.3.3 Rekombinante Proteinexpression und Reinigung bakterieller Porine

Die Herstellung der bakteriellen Porine erfolgte unlöslich in Form von *inclusion bodies* (IB) in einem *E. coli*-BL21 (*DE3*)- Δ *porin* Deletionsstamm. Dafür wurden 400 ml LB-Medium in einem 1 L-Schüttelkolben mit dem entsprechenden Antibiotikum und 5 ml der Übernachtskultur versetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bei 30°C angezogen. Nach Erreichen dieser optischen Dichte wurde die Kultur für weitere 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Expression der gewünschten Porine mit 0,33 mM Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert.

Nach einer vierstündigen Proteinexpression wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4.000 x g für 15 min geerntet und in 40 ml Puffer A, versetzt mit 1 μ g/ml *DNase*I und 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in

einem Hochdruckhomogenisator durch fünf Passagen mit etwa 500-700 mbar Druck (Gaulin Micron Lab 40, APV Homogenisator GmbH, Lübeck). Nach Zentrifugation für 10 min bei 10.000 x g, wurde das Pellet zweimal in Puffer A mittels Ultraschall gewaschen. Zur Entfernung des Detergens Triton X-100 wurden die IBs in Puffer B resuspendiert und nochmals pelletiert.

Puffer A	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% Triton X-100
Puffer B	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA

Die Solubilisierung und Renaturierung erfolgte für die jeweiligen Porine entsprechend und ist nachfolgend aufgeführt.

PorB_{W135}-Wildtyp, PorB_{W135}-Mutanten und FomA

Die IBs wurden in 1,25 ml Puffer C solubilisiert. Das Volumen wurde dabei so gewählt, dass die Konzentration solubilisierter Proteine etwa 10 mg/ml entsprach. Für eine bessere Solubilisierung wurden die IBs anschließend 30 s geschüttelt und nochmals 60 s im Ultraschallbad inkubiert. Das in Lösung gebrachte Protein wurde durch eine schnelle 1:2 Verdünnung in eiskalten Puffer D überführt, 30 s geschüttelt und 4 min im Ultraschallbad inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 20.000 x g für 30 min entfernt. Die Reinigung erfolgte durch Größenausschlusschromatographie mit der Säule HiPrep Sephacryl S-200 16/60 (GE Healthcare), die zuvor mit Puffer E äquilibriert wurde. Die dem trimeren Porin entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt und in einem 10 kDa MWCO-Aufkonzentrierungsröhrchen (Amicon) auf ein Volumen von etwa 200 µl konzentriert.

Puffer C	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 7,8 M Harnstoff
Puffer D	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 10% LDAO
Puffer E	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,1% LDAO

2.3.4.1 Expression von sTLR2 in *Pichia pastoris* und Reinigung

Für die Genexpression wurden 25 ml BMGY-Medium in einem 250 ml-Schüttelkolben mit dem zuvor transformierten Klon angeimpft und für 24 Stunden bei 30°C und 200 U/min (Infors HT Inkubator) inkubiert. Diese Vorkultur wurde pelletiert und das Pellet in 100 ml BMMY-Medium auf eine OD₆₀₀ von 1,0 verdünnt. Die Expression erfolgte über eine Dauer von 56 Stunden und wurde durch Zugabe von 0,5% Methanol nach jeweils 24 Stunden aufrechterhalten. Die Zellen wurden mit 5.000 x g für 15 min pelletiert und mittels Kugelmühle und Glaskugeln (Ø 0,5 mm) im Resuspensionspuffer homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden von den Zellmembranbestandteilen durch Zentrifugationsschritte von 10.000 x g für 10 min bzw. anschließenden 100.000 x g für 90 min voneinander getrennt und die Membranfraktion für weitere Analysen auf Eis gehalten. Der lösliche Überstand wurde auf eine HisTrap FF 5 ml Chromatographiesäule (GE Healthcare) geladen, welche vorher mit dem Resuspensionspuffer äquilibriert wurde. Unspezifisch gebundene Proteinen wurden mit 50 Säulenvolumen Waschpuffer entfernt und das gewünschte Protein mit vier Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert.

BMGY-Medium	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 100 ml/l 1 M Phosphatpuffer pH 6,0, 34 g/l <i>yeast nitrogen base</i> , 100 g/l Ammoniumsulfat, 0,4 mg/l Biotin, 100 ml/l Glyzerin
BMMY-Medium	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 100 ml/l 1 M Phosphatpuffer pH 6,0, 34 g/l <i>yeast nitrogen base</i> , 100 g/l Ammoniumsulfat, 0,4 mg/l Biotin, 100 ml/l Methanol
Resuspensionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 30 mM Imidazol
Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 80 mM Imidazol
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 500mM Imidazol

Auch die Zellmembranfraktion wurde auf das mögliche Vorhandensein des Rezeptors untersucht. Dafür wurde die Membranfraktion mit 1x PBS pH 7,5, 150 mM NaCl auf eine Konzentration von 3 mg/ml aliquotiert und in einem Endvolumen von 1 ml mit verschiedenen Detergenzien für eine Stunde bei 4°C unter Rühren inkubiert (1x PBS pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Detergens). Unlösliche Bestandteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt von 21.000 x g für 60 min entfernt. Die Solubilisierungseffizienz der unterschiedlichen Detergenzien wurde durch GFP-Anregung visuell analysiert (LAS4000, Fujifilm).

2.3.4.2 Expression von sTLR2 in *Saccharomyces cerevisiae* und Reinigung

Die Vorkultur mit 150 ml –URA-Medium/2% Glukose wurde in einem 500 ml-Schüttelkolben mit einer transformierten Einzelkolonie beimpft und mit 220 U/min (Infors HT Schüttelinkubator) bei 30°C für 24 Stunden inkubiert. Diese wurde anschließend in 1 L -URA/0,1% Glukose auf eine OD₆₀₀ von 0,12 in einem 2,5 L-Schüttelkolben verdünnt, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert und die Proteinexpression mit 2% Galaktose induziert. Nach 22 Stunden wurden die Zellen geerntet (4000 x g, 20 min) und, falls nicht sofort weiter verarbeitet, bei - 80°C gelagert.

Für den Aufschluss wurden die Zellen auf etwa 150 g/l mit Resuspensionspuffer verdünnt, wobei das eingesetzte Volumen 48 ml betrug (7,5 g Gesamtzellmasse). Die gesamte Zellmasse wurde mit jeweils 1 ml Volumen auf 2 ml-Reaktionsgefäße gleichmäßig verteilt und mit Glaskugeln (Ø 0,5 mm) auf 1,5 ml aufgefüllt. Die Homogenisation erfolgte anschließend im TissueLyser-II für 15 min bei 30 Hz. Die Suspension wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in warmem Wasser wieder aufgetaut und für 2 min bei 20.000 x g pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Insgesamt wiederholte sich diese Prozedur dreimal, sodass zum Schluss ein Volumen von etwa 144 ml resultierte. Die Membranen wurden danach durch Zentrifugation bei 100.000 x g für 90 min pelletiert.

Analog zur Expression in *P. pastoris* (2.3.4.1) wurden sowohl der Überstand als auch die Zellmembranen auf die Anwesenheit des rekombinanten sTLR2 analysiert.

Für die Aufreinigung des Proteins aus dem Überstand wurde dieser mit 5 ml Ni-NTA Säulenmaterial (Ni-NTA Superflow, Qiagen) für 1 Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend in eine Säule gepackt. Diese wurde mit 80 Säulenvolumen Waschpuffer von unspezifisch gebundenen Proteinen gereinigt und das Protein mit vier Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert.

Resuspensionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 30 mM Imidazol
Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 80 mM Imidazol
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol

Die Aufreinigung des sTLR2 aus pelletierten Membranen erfolgte zunächst durch Solubilisierung von etwa 4 g Membranen im Solubilisierungspuffer unter Rühren für 60 min bei 4°C. Unlösliche Bestandteile wurden anschließend mit 100.000 x g für 60 min

abzentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und auf eine mit 5 ml Volumen gepackte Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA Superflow, Qiagen) aufgetragen, welche mit dem Äquilibrierungspuffer für die Reinigung vorbereitet wurde. Für eine effiziente Matrixbindung wurde der Durchfluss insgesamt dreimal auf die Säule geladen. Danach erfolgte ein Waschschriff mit 80 Säulenvolumen Waschpuffer und die Elution des Proteins mit vier Säulenvolumen Elutionspuffer.

Solubilisierungspuffer	1x PBS pH 7,5, 150 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 1% LDAO
Äquilibrierungspuffer	1x PBS pH 7,5, 150 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 0,01% LDAO
Waschpuffer	1x PBS pH 7,5, 150 mM NaCl, 90 mM Imidazol, 0,01% LDAO
Elutionspuffer	1x PBS pH 7,5, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 0,01% LDAO

Wurde der sTLR2-Rezeptor mit einer MBP-Fusion exprimiert (im Fall von MBP_sTLR2VLRB_GFP), erfolgte nach der Ni-NTA eine zweite Affinitätschromatographie, in welcher das MBP des Fusionsproteins spezifisch an eine Amylosesäule bindet und dadurch der Rezeptor durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt gereinigt werden konnte. In diesem Fall wurde das Protein mittels einer Amicon Aufkonzentrierungseinheit (MWCO: 30 kDa) in den MBP-Äquilibrierungspuffer umgepuffert. Anschließend wurde die mit dem MBP-Äquilibrierungspuffer äquilibrierte Säule (MBPTrap HP 5 ml, GE Healthcare) mit der Proteinlösung beladen, mit zehn Säulenvolumen MBP-Äquilibrierungspuffer von unspezifisch gebundenen Proteinen gewaschen und der sTLR2 mit fünf Säulenvolumen MBP-Elutionspuffer eluiert.

Die Entfernung des MBP vom Fusionsprotein MBP_sTLR2VLRB_GFP erfolgte durch Inkubation des gereinigten Rezeptors mit Enterokinase (New England Biolabs) in einem Verhältnis von 1 mg Fusionsprotein/6,4 ng Enterokinase in 20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ für 16 Stunden bei Raumtemperatur.

Für die anschließende Entfernung des MBP aus der Proteinlösung wurde die mit MBP-Äquilibrierungspuffer äquilibrierte MBPTrap HP-Säule (GE Healthcare) mit der Proteinlösung beladen, wobei der sTLR2-enthaltene Durchfluss gesammelt wurde. Die Entfernung des MBP-Proteins von der Säule wurde mit fünf Säulenvolumen MBP-Elutionspuffer durchgeführt. Erfolgte die Reinigung als auch die MBP-Abspaltung mit dem Protein, welches aus der löslichen Fraktion gereinigt wurde, enthielten alle verwendeten Puffer kein Detergens.

MBP-Äquilibriumspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,01% LDAO
MBP-Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,01% LDAO, 10 mM Maltose

Zur Entfernung des GFP vom Fusionsprotein wurde zum gereinigten sTLR2 die äquivalente Menge an TEV-Protease zugegeben, die über einen His-tag verfügte. Diese Lösung wurde über Nacht in einer Dialysemembran (MWCO: 10 kDa) bei 4°C gegen drei Liter DB-Puffer umgepuffert. Anschließend wurde eine 5 ml HisTrap-Säule (GE Healthcare) mit DB-Puffer äquilibriert und mit der Proteinlösung beladen, wobei der sTLR2-enhaltene Durchfluss gesammelt wurde. Die Elution der TEV-Protease von der Säule erfolgte mit 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,01% LDAO, 500 mM Imidazol.

Erfolgte die Reinigung als auch die GFP-Abspaltung mit dem Protein, welches aus der löslichen Fraktion gereinigt wurde, enthielten alle verwendeten Puffer kein Detergens.

DB-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,01% LDAO
-----------	--

2.3.4.3 Expression von sTLR2 in der HEK293-Zelllinie

Der in der humanen HEK293-Zelllinie (*human embryonic kidney*, menschliche embryonale Nierenzellen) exprimierte, extrazelluläre Bereich des TLR2 (sTLR2) verfügte über einen C-terminalen Fc-tag des Maus-IgG2a-Antikörpers (sTLR2Fc) und konnte über eine Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Das bereits präparierte sTLR2Fc-Protein wurde freundlicherweise von Paola Massari (School of Medicine, Boston University) zur Verfügung gestellt.

2.3.5 Proteinexpression in Minimalmedium

Selenomethionin-Varianten des Porins FomA aus *F. nukleatum* wurden in Minimalmedium im *E. coli* B834 (DE3)-Stamm exprimiert. Dafür wurde eine Einzelkolonie in 20 ml Minimalmedium (+ 5% LB-Medium) bei 30°C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Inokulation von 1,5 L Minimalmedium (+ 100 mg/ml Ampicillin) mit 15 ml der Vorkultur

und die Inkubation bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3. Die Proteinexpression wurde mit 200 µM IPTG induziert und die Zellen nach vier Stunden pelletiert (4000 x g, 20 min). Die Renaturierung und Reinigung von FomA erfolgte analog zu 2.3.3, wobei alle verwendeten Puffer zusätzlich 1 mM DTT enthielten.

Minimalmedium 1 g/l Ammoniumsulfat, 4,5 g/l Kaliumdihydrogenphosphat, 10,5 g/l Dikaliumhydrogenphosphat, 0,5 g/l Natriumzitat, 0,8 g/l L-Aminosäuregemisch (19 Aminosäuren ohne Methionin zu jeweils ~42 mg), 0,5 g/l Nukleotid-Mix (je 125 mg pro Nukleotid), 12,5 ml/l Glukose 40% (w/v), 1 ml/l Magnesiumsulfat (1 M), 0,4 ml/l Thyamin (10 mg/ml), 2 ml/l D-Biotin (2 mg/ml), 3 ml/l L-Selenomethionin (10 mg/ml).

2.3.6 Western-Blot

Für die Western-Blot Analyse wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (2.3.2) auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran im *semidry*-Verfahren im elektrischen Feld pro Gel mit 50 mA und 100 V für 90 min in Transferlösung geblottet. Danach wurde die Membran zuerst in Blocklösung für eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend mit dem primären Maus-anti-His-Antikörper (2000fache Verdünnung in Waschlösung, Gesamtvolumen 20 ml, Roche) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine dreimalige Inkubation der Membran in der Waschlösung für je fünf Minuten und der anschließenden Inkubation mit dem, abhängig von der gewählten Detektionsmethode, sekundären HRP- (*horseradish peroxidase*) bzw. AP- (alkalische Phosphatase) konjugiertem anti-Maus-Antikörper (5000fache Verdünnung in Waschlösung, Gesamtvolumen 20 ml, Millipore) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dem dreimaligen Waschen für fünf Minuten schloss sich die Entwicklung der Membran an. Erfolgte die Detektion nach der HRP-Methode, wurde die Membran in einer Mischung aus 1 ml ECL1 und ECL2 Lösung (ECL Western Blotting Substrat, Pierce) nach Herstellerangaben inkubiert und durch die Detektion der Chemolumineszenz (LAS4000, Fujifilm) für 20 min entwickelt. Für die Detektion der Membran nach der AP-Methode wurde diese in 10 ml AP-Entwicklerlösung bis zur gewünschten Bandenschärfe (etwa 2 min) inkubiert.

Transferlösung	10 mM Tris-HCl pH 7,2, 38 mM Glyzin, 100 ml/l Methanol
Blocklösung	5% (w/v) Milchpulver in PBS, 0,02% Tween20
PBS	10 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,2, 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Waschlösung	1x PBS, 0,02% Tween20
AP-Entwicklerlösung	0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 5 mM MgCl ₂ , 3,3 mg (in 100% Dimethylformamid, DMF) 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP), 6,6 mg (in 70% DMF) <i>nitro-blue</i> Tetrazoliumchlorid (NBT)

2.3.7 Massenspektrometrie

Für die Analyse des Peptid-*finger prints* wurde die jeweilige Proteinbande aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und einem tryptischen Verdau unterzogen. Die MALDI-MS-Spektren wurden an einem Ultraflex-II TOF/TOF-Massenspektrometer aufgenommen. Alle massenspektrometrischen Analysen wurden von Frau Dr. Schierhorn (Institut Biochemie/Biotechnologie, Universität Halle) durchgeführt.

2.3.8 Circular dichroismus (CD)

Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte an einem J-810 Spektropolarimeter (Jasco) mit 1 nm Spaltbreite, einer Messgeschwindigkeit von 50 nm/min und 20°C Messtemperatur. Datenpunkte wurden alle 0,5 nm aufgenommen und die Spektren insgesamt 60fach akkumuliert. Verwendete Proteinkonzentrationen betragen 0,7-1 mg/ml und wurden in Quarzglasküvetten (Suprasil, Hellma) vermessen. Die Messungen wurden im Bereich von 260-190 nm im Fern-UV mit 1 mm Küvettschichtdicke durchgeführt. Alle pufferkorrigierten Spektren wurden auf die mittlere Elliptizität (Gleichung 2.2) normiert.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\theta \cdot M}{10 \cdot d \cdot c \cdot N} \quad \text{Gleichung 2.2}$$

$[\Theta]_{MRW}$	mittlere residuale Elliptizität ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)
Θ	gemessene Elliptizität (mdeg)
M	molare Masse (g/mol)
c	Proteinkonzentration (mg/ml)
N	Anzahl der Aminosäuren
d	Küvettschichtdicke (cm)

Denaturierungsexperimente wurden zur Analyse der Stabilitätsparameter thermisch durchgeführt. Alle Rohdaten wurden zuerst nach Gleichung 2.3 normiert.

$$Fn = \frac{y-yu}{yf-yu} \quad \text{Gleichung 2.3}$$

Fn	Anteil natives Protein
y	Messwert
yu	Messwert entfaltetes Protein
yf	Messwert gefaltetes Protein

Für thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge wurde folgendes Model zur Berechnung verwendet (Griko *et al.*, 1988).

$$y = \frac{(Fn+mn \cdot x)+(Fu+mu \cdot x) \cdot \exp \left[\left(\frac{\Delta Hu}{R} \right) \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{Tm} \right) \right] - \Delta Cp/R \left[1 - \frac{Tm}{T} + \ln \left(\frac{Tm}{T} \right) \right]}{1 + \exp \left[\left(\frac{\Delta Hu}{R} \right) \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{Tm} \right) \right] - \Delta Cp/R \left[1 - \frac{Tm}{T} + \ln \left(\frac{Tm}{T} \right) \right]} \quad \text{Gleichung 2.4}$$

2.3.9 Fluoreszenzspektroskopie

Tryptophan-Fluoreszenzspektren wurden durch Anregung bei einer Wellenlänge von 295 nm und die Emission im Bereich von 300-400 nm über einen Zeitraum von 60 s und 20°C gemessen. Messpunkte wurden in Abständen von 1 nm mit einer Detektion und Integration jeden Punktes von 0,2 s aufgenommen. Die Spaltbreiten betragen 5 nm während der Anregung und 8 nm während der Emission. Gemessen wurde an einem Horiba Jobin Y (Instruments S.A., Inc) mit Quarzküvetten (Suorasil, Hellma) von 1 cm Schichtdicke.

2.4 Ligandenbindungsexperimente

2.4.1 Größenausschlusschromatographie

Anhand der Änderung der Elutionsprofile sollte mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie die Komplexbildung zwischen der löslichen Domäne des *Toll-like* Rezeptors 2 (sTLR2) und PorB_B analysiert werden. PorB_B (400 μM) wurde dafür im fünffachen molaren Überschuss mit sTLR2Fc (80 μM) in einem Puffervolumen von 2 ml (50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1% LDAO) versetzt und für 90 min auf Eis inkubiert. Die Proteinlösung (1 ml) wurde auf eine Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare) geladen und mit einem konstanten Fluss von 0,4 ml/min über 1,2 Säulenvolumen (28 ml) eluiert.

2.4.2 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Quantitative Aussagen zu Protein-Ligand-Bindungsgleichgewichten lassen sich mit der Methode der isothermalen Titrationskalorimetrie treffen. Dabei wird die Kompensationswärme in der Referenzzelle gemessen, welche benötigt wird, um konstante Temperaturdifferenzen zwischen der Proben- und Messzelle zu halten. Es werden generell Gleichgewichtstitrationen durchgeführt, sodass sich die bei der Wiederherstellung des Reaktionsgleichgewichts freigesetzten Wärmemengen als Produkt aus Bindungsenthalpie und Stoffumsatz errechnen lassen können. Mit der Annahme des einfachsten Bindungsmodells mit einer Bindestelle kann die experimentell bestimmte Wärme Δq , die bei der Zugabe des Liganden entsteht, durch folgende Gleichung beschrieben werden (Leavitt und Freire, 2001),

$$\Delta q = V \cdot \Delta H \cdot [P] \cdot \left(\frac{K_a [L]_i}{1 + K_a [L]_i} - \frac{K_a [L]_{i-1}}{1 + K_a [L]_{i-1}} \right) \quad \text{Gleichung 2.5}$$

wobei V das Volumen der Messzelle, [P] die Proteinkonzentration, [L] die Konzentration an freiem Liganden, ΔH die charakteristische Bindungsenthalpie und ΔL_i die Differenz der Konzentration des komplexierten Liganden zwischen zwei aufeinanderfolgenden Injektion darstellt. Nach Berechnung der Änderung der freien Enthalpie

$$\Delta G = - RT \cdot \ln K_a \quad \text{Gleichung 2.6}$$

lässt sich über das Gibbs-Helmholtz-Gesetz auch die Änderung der Entropie des Systems berechnen.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad \text{Gleichung 2.7}$$

Die Titrationsexperimente wurden an einem NanoITC 2G (TA Instruments) bei 20°C durchgeführt, wobei die Interaktionspartner für 16 Stunden gegen 20 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,01% LDAO dialysiert (MWCO: 14 kDa) wurden. Die Probe wurde filtriert und entgast. Die initiale Konzentration wurde auf 100 μM (PorB_B) und 10 μM (TLR2) eingestellt. Die Rührgeschwindigkeit betrug 150 U/min. Jede Messung bestand aus 19 Injektionen zu je 13 μl mit Abständen von 420 s für die Wiederherstellung des thermodynamischen Gleichgewichts. Die Verdünnungswärme wurde dabei durch Titration des Liganden in der Spritze gegen Puffer in der Messzelle ermittelt und bei der Auswertung der Daten subtrahiert.

2.4.3 *pull-down*-Assay

Der *pull-down*-Assay basiert auf einer spezifischen Affinität eines Zielmoleküls zu seinem Interaktionspartner, wobei der Protein-Protein-Komplex isoliert und gereinigt werden kann. Ein Interaktionspartner verfügt dabei über einen Bereich, der spezifisch an eine Säulenmatrix bindet, wohingegen der zweite Interaktionspartner aufgrund dieses fehlenden Bereichs nicht an die gleiche Matrix binden kann. Erfolgt nach ausgiebigem Waschen anschließend eine Co-Elution beider Partner, ist dies ein Hinweis auf eine Protein-Protein-Interaktion, da der zweite Interaktionspartner nur durch Bindung an den ersten Interaktionspartner auf der Matrix verbleibt und schließlich co-eluiert werden kann. Durch Kontrollversuche muss gezeigt werden, dass keine unspezifische Bindung des zweiten Interaktionspartners an die Säule erfolgt. Das MBP_sTLR2VLRB_GFP-Konstrukt (sTLR2 mit N-terminaler MBP-Domäne und C-terminalem GFP-tag) verfügte C-terminal über einen 8x His-tag und wurde dementsprechend über eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie (Ni²⁺-AC) gereinigt, wohingegen der in HEK-Zellen exprimierte sTLR2Fc einen C-terminalen Fc-tag enthielt und spezifisch über eine Protein A-Affinitätschromatographie (Protein A-AC) isoliert werden konnte. Beide Interaktionspartner wurden zuvor im Reaktionsgefäß vermischt und anschließend auf die

Säule geladen. Mit dieser Methode sollte die Interaktion zwischen PorB_B und sTLR2 für beide sTLR2-Konstrukte analysiert werden.

Nach einer Inkubation beider Partner von 60 min auf Eis in 2 ml Puffer A erfolgte die Beladung der entsprechenden Affinitätssäulenmatrix mit dem Proteingemisch, wobei der Durchfluss gesammelt und für eine effizientere Bindung nochmals dreimal auf die Säule gespült wurde. Zur Entfernung unspezifischer Matrixinteraktionen wurde die Säule mit 80 Säulenvolumen Puffer B gewaschen. Die Co-Elution erfolgte schließlich mit vier Säulenvolumen Puffer C. Die Elutionsfraktion der Protein A-Affinitätschromatographie wurden sofort mit 1 M Tris pH 9,0 (0,3 ml pro ml Endvolumen) neutralisiert.

Puffer A	50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05% LDAO
Puffer B (Ni ²⁺ -AC)	50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05% LDAO, 80 mM Imidazol
Puffer B (Protein A-AC)	50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05% LDAO
Puffer C (Ni ²⁺ -AC)	50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05% LDAO, 500 mM Imidazol
Puffer C (Protein A-AC)	0,1 M Zitronensäure pH 2,75, 0,05% LDAO

2.5 Rekonstitution von Porinen in künstliche Membransysteme

2.5.1 Herstellung von Proteoliposomen

Die Herstellung von multilamellaren Proteoliposomen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll (Olesky *et al.*, 2006) mit dem *E. coli crude lipid extract* (Avanti Polar Lipids). Für die Herstellung von Proteoliposomen zur Analyse des Zuckertransports wurden 2 mg und für den Antibiotikatransport 20 mg Lipid eingesetzt. Die Lipide wurden in einem Rundhalskolben an einem Rotationsverdampfer (Heidolph) unter Vakuum für 20 min und 115 U/min eingetrocknet, mit 800 µl Pentan gewaschen und nochmals für 20 min getrocknet. Anschließend wurden die Lipide in jeweils 200 µl Wasser für 60 min durch kontinuierliches Rühren resuspendiert und zu je 100 µl auf zwei neue Rundhalskolben aufgeteilt. Es folgte die Zugabe des Proteins in einen der beiden Kolben, wobei in den anderen das gleiche Volumen an Wasser zugegeben wurde, welche die Negativkontrolle repräsentierte. Sollten die Proteoliposomen zur Analyse des Zuckertransports verwendet werden, wurden 0,5 µg Protein pro mg Lipid eingesetzt und für den Transport von Antibiotika 6 µg Protein pro mg Lipid.

Dabei erfolgte die Zugabe des Proteins immer aus einer Stammlösung (20-30 mg/ml), um den gleichzeitigen Zusatz an Detergens so niedrig wie möglich zu halten. Für die Bildung der multilamellaren Liposomen wurden beide Kolben bis zur Transluzenz in ein Ultraschallbad gehalten (etwa 2-3 min). Anschließend erfolgte die Trocknung der Liposomen zuerst in einer Vakuumzentrifuge für 2 Stunden und danach über Nacht in einem abgedunkelten Exsikkator. Es folgte die Resuspension der Liposomen in 500 μ l 5 mM Dextran T-40, 5 mM Tris-HCl pH 8 (für Zuckertransport) bzw. 800 μ l 12 mM Stachyose, 1 mM NAD-Imidazol pH 6 (pH-Wert der 1 mM NAD-Lösung wurde mit Imidazol auf pH 6 eingestellt), 4 mM Na-NAD (Antibiotikatransport). Dabei wurde das Reaktionsgefäß die ersten 30 min vorsichtig per Hand und die anschließenden 30 min mit Vortex geschüttelt, gefolgt von einer Inkubation für 1 Stunde ohne Schütteln bei Raumtemperatur.

2.5.2 Liposomenschwellungsanalyse

Die Analyse des Zucker- und Antibiotikatransports in Porinen erfolgte durch eine Liposomenschwellungsanalyse (*liposome swelling*) nach einem modifizierten Protokoll (Tanabe *et al.*, 2010; Olesky *et al.*, 2006).

Zuckertransport

Untersucht wurde der Transport von Einfach- bis Vierfachzuckern in den Porinen PorB_B, OmpP2 und FomA. Alle Zuckerlösungen wurden als Stammlösungen (0,5 M Zucker, 5 mM Tris-HCl pH 8) hergestellt. Für jede neue Liposomenpräparation wurde die isoosmotische Konzentration, welche der anschließenden Konzentration der zu analysierenden Zucker entsprach, zu Beginn empirisch ermittelt. Dafür wurden unterschiedliche Konzentrationen (20-100 mM) von Stachyose (PorB_B-Analyse) bzw. Dextran T-3 (OmpP2-, FomA-Analyse) mit Proteoliposomen (10 μ l) gemischt und die Zuckerkonzentration ermittelt, welche weder zu einem An- noch einem Abschwollen der Liposomen führte. Die Liposomenschwellung erfolgte durch Mischen von 500 μ l der jeweiligen Zuckerlösung mit 10 μ l Liposomensuspension und Aufnahme von Messpunkten im Abstand von 1 s über einen Zeitraum von drei bis vier Minuten bei 400 nm (TECAN, Infinite M200). Jeder gemessene Zuckertransport wurde sowohl für Proteoliposomen als auch in Kontrollliposomen dreifach vermessen und anschließend gemittelt.

Antibiotikatransport

Es wurden Antibiotika-Stammlösungen von 0,5 M in 1 mM NAD-Imidazol pH 6,0 hergestellt. Für jedes Antibiotikum musste zu Beginn die Konzentration ermittelt werden, welche in Kontrollliposomen ohne inkorporiertes Porin keine Schwellung verursachte. Mit der ermittelten Konzentration wurde danach der Transport in den Proteoliposomen analysiert. Jeweils 500 µl der Antibiotikallösung wurden mit 10 µl Liposomen gemischt und das Signal bei 400 nm (TECAN, Infinite M200) mit Messpunkten im Abstand von 1 s über einen Zeitraum von drei Minuten aufgenommen. Alle Messungen wurden stets in Dreifachbestimmung aufgezeichnet und gemittelt. Die Anpassung der Rohdaten erfolgte jeweils durch exponentielle Annäherung mit SigmaPlot. Um die Transportänderung im Vergleich zum Wildtyp beurteilen zu können, wurde stets die Absorptionsänderung nach 160 Sekunden für die Berechnung verwendet.

2.6 Röntgenkristallstrukturanalyse

2.6.1 Kristallisation von Membranproteinen

Die Überführung eines Proteins von der flüssigen in die feste Phase ist die Voraussetzung für die Bildung von Proteinkristallen und der darauffolgenden Röntgenbeugungsanalyse. Durch den Einsatz von wasserentziehenden Substanzen (Präzipitanten) wird die Löslichkeit der Proteine in der Lösung verringert. Mit ansteigender Präzipitantkonzentration wird die Löslichkeit der Proteine in der Lösung herabgesetzt und die Sättigungsgrenze vom untersättigten hin zum metastabilem Bereich überschritten. In diesem erfolgt zwar noch kein neues Kristallwachstum, aber bereits die weitere Ausbildung von existierenden Nukleationskeimen. Die fortschreitende Verringerung der Löslichkeit führt die Lösung in den übersättigten Bereich (labiler Bereich). In diesem Bereich kann ein kontinuierliches Kristallkeimwachstum (Nukleation) erfolgen, wobei dies stark von den in der Lösung herrschenden Bedingungen abhängt und optimal im Hinblick auf die Proteinstabilität sein muss. Durch das Kristallwachstum sinkt die Proteinkonzentration in der Lösung immer weiter, sodass der metastabile Bereich erreicht wird, in welchem das Kristallwachstum fortschreitet. Wie bereits erwähnt, hängt das Kristallwachstum auch von den Bedingungen innerhalb der Proteinlösung ab (z.B. pH, Salzkonzentration, Temperatur, Proteinkonzentration). Zusätzlich muss das Herabsetzen der Löslichkeit in der Lösung

kontinuierlich und langsam erfolgen, da eine zu schnelle Präzipitation hin zum übersättigten Bereich die Aggregation und nicht das Kristallwachstum fördert. Diese langsame Verringerung der Löslichkeit wird durch die Dampfdiffusion im geschlossenen System (*hanging* oder *sitting drop*) erreicht. Dabei wird durch einen hergestellten Konzentrationsunterschied an Präzipitant zwischen Kristallisationstropfen und der Reservoirlösung eine konzentrationsausgleichende Wasserdiffusion vom Tropfen zur Reservoirlösung induziert, da hier die Präzipitantkonzentration höher ist. Dadurch erfolgt eine Erhöhung der Präzipitant- als auch Proteinkonzentration im Tropfen, welche das Kristallwachstum positiv beeinflussen kann.

Die Kristallisation von Membranproteinen erfolgte durch Dampfdiffusion mit hängendem (*hanging drop*) aber auch sitzendem (*sitting drop*) Tropfen. Das im Detergens solubilisierte und gereinigte Membranprotein wurde mit einer Amicon-Konzentrationseinheit (Milipore) mit einer Porenausschlussgröße von 10 kDa (PorB_{men}) bzw. 50 kDa (OmpP2, FomA) auf Konzentrationen von 20 und 10 mg/ml konzentriert. Dabei wurde die initiale Identifizierung von geeigneten Kristallisationsbedingungen zuerst im 96-*well*-Maßstab im Nanoliter-Bereich durchgeführt. Durch einen Pipettierroboter (Cartesian Microsys, Zinsser-Analytik, Frankfurt/M.) wurden jeweils 200 nl Proteinlösung mit 200 nl Reservoirlösung der einzelnen Kristallisation-Screening-Kits in der *sitting drop*-Methode gemischt und bei 16°C inkubiert. Der Kristallisationsverlauf wurde anschließend mittels eines Mikroskops (Leica M205C) verfolgt. Konnte ein Kristallwachstum festgestellt werden, erfolgte ein *fine-screening* im 24-*well*-Format und der *hanging drop*-Dampfdiffusionsmethode. Dabei wurde eine identische Reservoirlösung mit einem Volumen von 1 ml hergestellt und davon 1 µl mit jeweils 1 µl der Proteinlösung gemischt. Im *fine-screening* wurden die Proteinkonzentration, der pH-Wert, sowie die Präzipitantkonzentration variiert.

Die Solubilisierung und Rekonstitution von Membranproteinen in Detergens-Mizellen ist eine für Membranproteine potentiell destabilisierende Umgebung und folglich kann dadurch die Stabilität des Proteins herabgesenkt werden, wie auch die Wahrscheinlichkeit der Kristallbildung. Wird ein Detergens mit einer langen Kohlenwasserstoffkette gewählt, bilden sich große Mizellen, die mit hydrophoben Proteinseitenketten interagieren und das Protein besser stabilisieren. Diese Detergenzien eignen sich zwar häufig gut für die Reinigung von Membranproteinen, aber nicht für ihre Kristallisation, da die für das Kristallwachstum essentiellen Kristallkontakte untereinander durch die Mizellen gestört oder nicht mehr ausgebildet werden können. Somit ist die Wahl eines geeigneten Detergens vom Reinigungsprozess bis hin zur Kristallisation häufig ein Kompromiss aus Proteininstabilität und

der potentiellen Möglichkeit der Ausbildung von Kristallkontakten. Häufige Praxis ist der Austausch eines langkettigen Detergens während der Proteinreinigung gegen eines mit einer kürzeren Kohlenwasserstoffkette für die Kristallisation.

2.6.2 Datensammlung und Datenprozessierung

Die entsprechenden Proteinkristalle wurden mit einer geeigneten Nylonschlinge aus dem Kristallisationstropfen aufgenommen, kurz in einen Puffertropfen mit Gefrierschutzmittel getaucht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das jeweilige Gefrierschutzmittel enthielt neben allen Reservoirbestandteilen jeweils eine erhöhte Präzipitantkonzentration von 30-35%. Die Datensammlung erfolgte mit Wellenlängen von 0,92-1 Å am Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung BESSY-II MX 14.1 (PorB_{W135}, Raumgruppe R32), an der *European Synchrotron Radiation Facility* ESRF ID29 (PorB_{W135}, Raumgruppe P6₃) und am *Swiss Lightsource* SLS PX-III (PorB_{W135}/anomales Signal für Cäsiumionen, PorB_{AKR}), SLS PX-II (PorB_B) und SLS PX-I (FomA, OmpP2). Die Aufnahmen des anomalen Signals von Schwermetall-Ionen zur Generierung initialer Phasen erfolgte an den Absorptions-kanten der jeweiligen Ionen im Bereich von 1-2 Å am *Swiss Lightsource* SLS (PX-I und III). Die aufgenommenen Streubilder wurden mit dem Programm HKL2000 prozessiert und skaliert (Otwinowski und Minor, 1997).

2.6.3 Strukturlösung, Verfeinerung und Strukturdarstellung

Die Strukturlösung erfolgte mit dem Suchmodell 3A2R (PorB_{W135}, Raumgruppe P6₃) für alle PorB_{W135}-Strukturen bzw. 4AUI (PorB aus *N. gonorrhoeae*) als Suchmodell für PorB_{AKR}. Zur Bestimmung initialer Phasen der Struktur der Porine FomA und OmpP2 wurde die Methoden des MIR (*multiple isomorphous replacement*) angewendet.

Strukturmodelle wurden mit dem Programm Coot (Emsley und Cotwan, 2004) in die Elektronendichten eingepasst und mit anschließenden iterativen Verfeinerungsrechnungen in REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) und CCP4 (Winn *et al.*, 2011) optimiert. Die Strukturvalidierung erfolgte mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

Die graphische Wiedergabe der Struktur- und Dichtedaten erfolgte mit dem Programm PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC).

3 Ergebnisse

3.1 Expression, Renaturierung und Reinigung bakterieller Porine

In der Literatur sind zwei Möglichkeiten der rekombinanten Gewinnung von Porinen beschrieben, welche durch Renaturierung aus *inclusion bodies* (IBs) oder der Reinigung des rekombinanten Porins durch Solubilisierung der Membranfraktion aus dem Expressionsorganismus erhalten werden können (Yldiz *et al.*, 2006, Massari *et al.*, 2006). Diesbezüglich hat die Reinigung des Proteins durch Renaturierung aus IBs den Vorteil, native Proteine mit deutlich höheren Proteinausbeuten zu erhalten (Qi *et al.*, 1994).

Da die Kristallisation der verwendeten Porine eine zentrale Bedeutung in dieser Arbeit darstellte, wurden alle Porinkonstrukte ohne N- als auch C-terminalen *tag* erstellt. Es ist bekannt, dass flankierende Peptidsequenzen von Proteinstrukturen eine große Flexibilität, teils sogar Unstrukturiertheiten aufweisen und somit weniger wahrscheinlich dreidimensionale Proteinkristallgitter ausbilden (Smyth *et al.*, 2003). Dies sollte durch die Entfernung flankierender Peptidsequenzen von vornherein unterbunden werden und erklärt, warum eine zytosolische IB-Expression in dieser Arbeit einer nativen Membranexpression vorgezogen wurde, welche ohne Affinitäts-*tags* wahrscheinlich mehrere chromatographische Reinigungsschritte beinhalten würde. Die für diese Arbeit verwendeten Plasmide und Konstrukte sind in 2.1.6 gezeigt. Alle Konstrukte wurden sequenziert (Firma GATC, Koblenz), um die Vollständigkeit des Inserts zu bestätigen oder eventuell vorhandene Mutationen zu identifizieren. Die Aminosäure- und Nukleotidsequenzen aller verwendeten Porine sind im Anhang (A.8) gelistet. Als Expressionsquelle zur Gewinnung der Porine wurde ein modifizierter *E. coli* BL21(DE3)- Δ porin-Deletionsstamm verwendet, welcher keine Gene für die Translation von *E. coli*-Porinen im Genom aufweist. Dies ist insofern wichtig, da nach Literatur (Kefala *et al.*, 2010) und eigenen Porin-Reinigungsexperimenten im kommerziell erhältlichen BL21(DE3)-Stamm, die Kontamination mit *E. coli*-Porinen während der rekombinanten Porinexpression trotz Einsatz eines spezifischen Expressionsvektors häufig nicht vollständig unterbunden werden kann. Aufgrund des nicht vorhandenen Reinigungs-*tags* als auch der häufig ähnlichen Porin-Molekulargewichte, würde in diesem Fall eine Proteinreinigung höchstwahrscheinlich problematisch werden.

3.1.1 Optimierung der Porinstabilität

Zu Beginn der Arbeit wurde das für PorB_{W135} etablierte Proteinreinigungsprotokoll nach Literaturangaben verwendet (Tanabe *et al.*, 2010). Trotz zahlreicher Versuche konnte eine Reproduzierbarkeit nicht erreicht werden, wobei das Protein nach Renaturierung stark präzipitierte und einen fortgeschrittenen Proteinabbau aufwies. Daher wurde der gesamte Prozess von der Proteinexpression und -reinigung bis zur Renaturierung für jedes Porin einzeln, neu etabliert (s. 2.3.3). Dabei wurde insbesondere der Renaturierungsprozess optimiert, um eine höhere Proteinstabilität zu erreichen. Durch eine Verringerung der Proteinkonzentration im Renaturierungspuffer von 20 auf 10 mg/ml, einer Erhöhung der Harnstoffkonzentration von 7,2 auf 7,8 M Harnstoff und einer längeren Inkubation (max. 16 Stunden) des Proteins im Renaturierungspuffer, konnte eine höhere Protein-Thermostabilität erreicht werden. Durch die Messung von thermisch-induzierten Entfaltungsübergängen mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie konnte bspw. für das Porin OmpP2 ein erhöhter Temperaturübergangsmittelpunkt (T_m) ($52,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$ auf $66,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$) beobachtet werden (Abb. 3.1). Alle weiteren Porine wurden anschließend nach dem modifizierten Protokoll gereinigt.

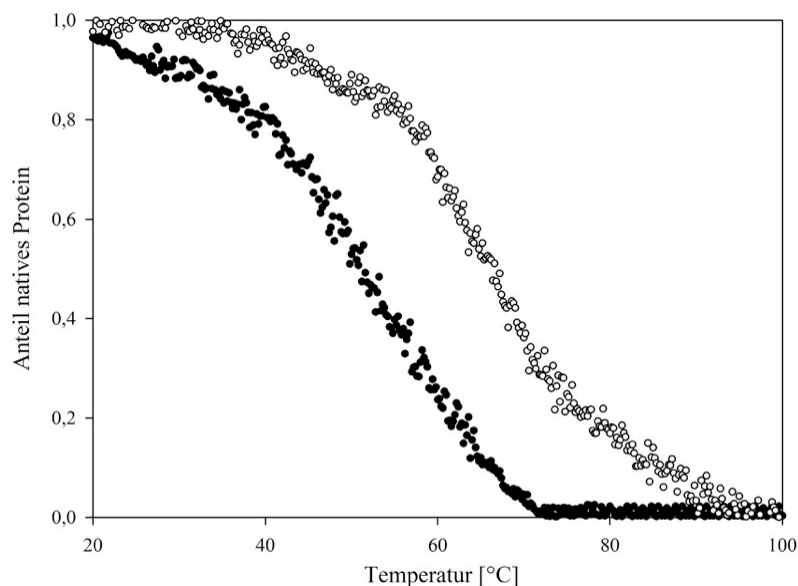


Abb. 3.1: Analyse der thermischen Entfaltungsübergänge von OmpP2 gemessen mit Fern-UV-Circulardichroismus. Die Spektren wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,1% LDAO aufgenommen. Durch die Optimierung des Renaturierungsprotokolles konnte für OmpP2 eine erhöhte Thermostabilität mit einer T_m von $52,4^\circ\text{C}$ vor (●) und $66,1^\circ\text{C}$ nach Optimierung (○) erzielt werden. Die Detektion der thermischen Entfaltung erfolgte bei einer Wellenlänge von 218 nm mit einer Proteinkonzentration von jeweils 1 mg/ml. Die Küvettschichtdicke betrug 1 mm.

3.1.2 Ein-Schritt Reinigung durch SEC-Gelfiltration

Die Reinigung der Porine schloss generell mit einem finalen Gelfiltrationslauf (*size exclusion chromatography*, SEC; Größenausschlusschromatographie) ab. Dadurch war es einerseits möglich, das Protein von weiteren Verschmutzungen zu isolieren, welche mit den zuvor durchgeführten Ultraschallwaschritten nicht vollständig erfolgte und andererseits, um ungefaltetes und aggregiertes Protein vom gefalteten Protein zu trennen. (Abb. 3.2). Das Retentionsvolumen des ersten Peaks (~ 36 ml) entsprach einer Molekulargröße, die einem höherwertigen Oligomerisierungszustand oder aggregiertem Protein zugeordnet werden konnte. Der zweite Peak unterschied sich im Maximum bei allen gereinigten Proteinen (PorB_{W135} 44,1 ml, PorB_B 51,5 ml, FomA 40,7 ml, OmpP2 42,7 ml) und entsprach in etwa den Molekulargewichten der Porine im trimeren Oligomerisierungszustand (berechnet durch Säulenkalibrierung).

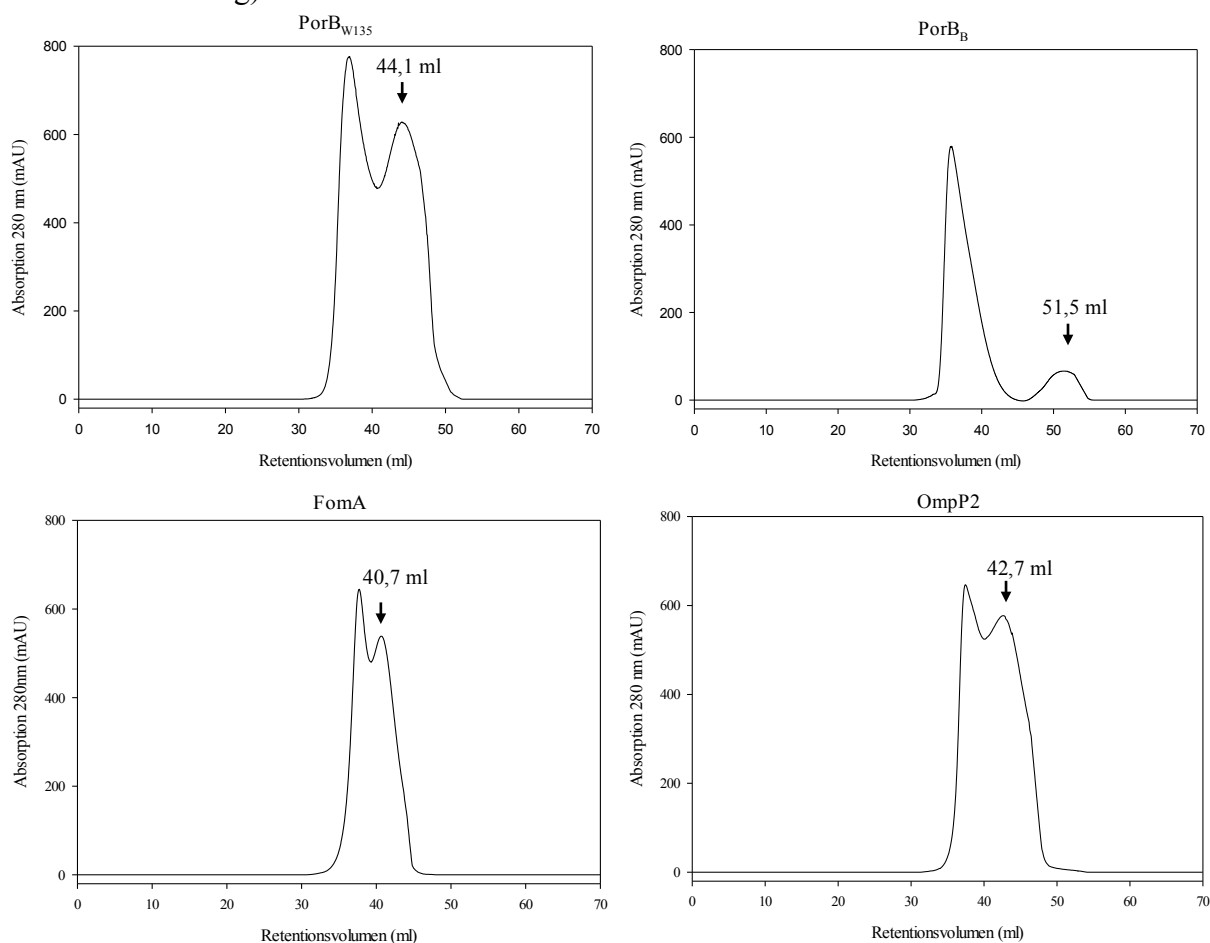


Abb. 3.2: SEC nach IB-Reinigung, Solubilisierung und Renaturierung der exprimierten Porine. Nach Renaturierung eluierten zwei Peaks über eine SEC (HiPrep Sephacryl S-200 16/60). Die Retentionszeit des zweiten Peaks, welcher wahrscheinlich dem gefalteten, trimeren Porin entspricht, unterscheidet sich bei allen Porinen dem Molekulargewicht entsprechend (2.3.1) und ist in den Abbildungen durch einen Pfeil markiert.

Die Elutionsprofile der SEC zeigten bis auf PorB_B (Abb. 3.2), eine nicht vollständige Auftrennung beider Elutionsfraktionen. Es wurde zu Beginn davon ausgegangen, dass lediglich die Fraktionen mit dem höheren Elutionsvolumen dem nativen, trimeren Porin entsprachen und es sich bei der anderen Fraktion um höher oligomerisiertes bzw. nicht korrekt gefaltetes Protein, mit möglicherweise geringerer Stabilität handelt. Um Aussagen über die Proteinestabilität der beiden Peaks treffen zu können, wurden thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge (20°C bis 100°C) mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie für FomA und OmpP2 aufgenommen (Abb. 3.3).

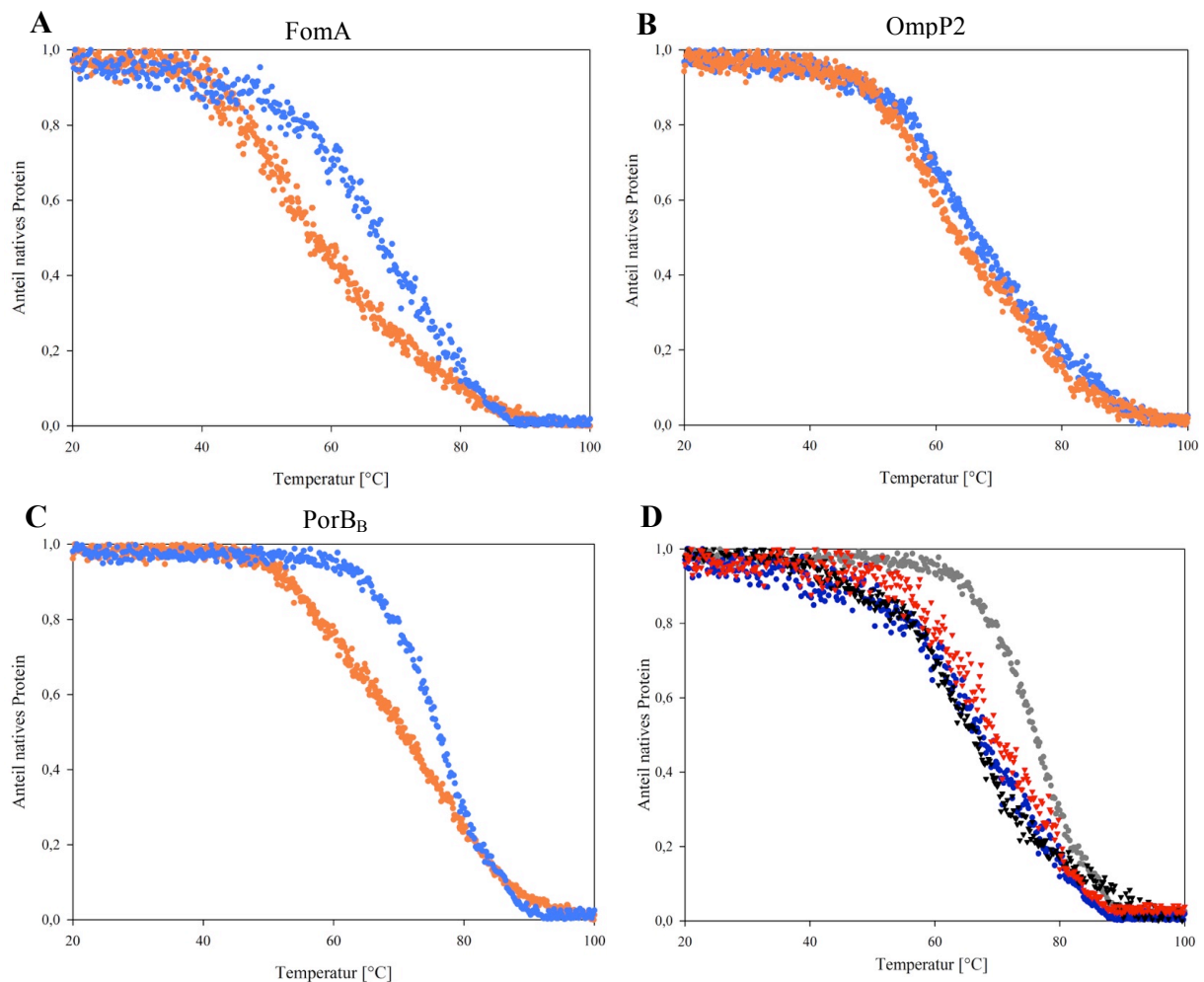


Abb. 3.3: Analyse der SEC-Fractionen durch Messung der thermischen Entfaltungsübergänge. Die Messung erfolgte mit Fern-UV-CD in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,1% LDAO mit Proben von FomA, OmpP2 und PorB_B aufgenommen. Dafür wurden die Peakmaxima vereinigt und ihre Thermostabilität getrennt voneinander untersucht. Es konnten T_m -Werte für die Fraktion mit niedrigerem Elutionsvolumen (●) von 58,6°C bzw. 69,1°C für die Fraktion mit größerem Elutionsvolumen (●) (FomA, **A**), 64,7°C bzw. 66,1°C (OmpP2, **B**) und 70,9°C bzw. 75,9°C (PorB_B, **C**) gemessen werden. Die Entfaltungsübergänge der Fraktion mit größerem Elutionsvolumen sind für FomA (●), PorB_{W135} (▼), OmpP2 (▼) und PorB_B (●) zusammengefasst dargestellt (**D**). Die Detektion der thermischen Entfaltung erfolgte bei einer Wellenlänge von 218 nm mit einer Proteinkonzentration von jeweils 1 mg/ml. Die Küvettenschichtdicke betrug 1 mm.

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 3.1) zeigt zusammenfassend die Thermostabilität der gemessenen Porine für beide SEC-Fractionen.

Tab. 3.1: Parameter der thermisch-induzierten Entfaltung der Porine. Die Fehler resultieren aus der Anpassung der Daten nach sigmoidalem Fit mit drei Parametern. Die Fraktion mit niedrigerem Elutionsvolumen ist als *void* bezeichnet, die Fraktion mit größerem Elutionsvolumen als *peak*.

	OmpP2	FomA	PorB_B	PorB_{W135}
T_m in °C <i>void</i>	64,7 ± 0,1	58,6 ± 0,1	70,9 ± 0,1	nicht gemessen
T_m in °C <i>peak</i>	66,1 ± 0,1	69,1 ± 0,2	75,9 ± 0,1	70,7 ± 0,1

Nach erfolgter SEC-Reinigung wurden die Proben über eine SDS-PAGE analysiert. Ein Beispiel für einen kompletten Reinigungsablauf vom Zellaufschluss bis zur finalen SEC-Reinigung ist exemplarisch für das Porin PorB_B in Abb. 3.4A gezeigt. Die weiteren Abbildungen (Abb. 3.4B-E) zeigen den finalen Reinheitsgrad der restlichen, renaturierten Porine nach erfolgter Proteinreinigung. Alle verwendeten Porine konnten bis auf wenige Verunreinigungen mit einer hohen Reinheit, nahezu homogen erhalten werden (Abb. 3.4A/4, B-E). Dabei können apparente Molekulargewichte von etwa 37 kDa für PorB_B bzw. PorB_{AKR} (Abb. 3.4A), etwa 38 kDa für OmpP2 (Abb. 3.4B), etwa 40 kDa für FomA (Abb. 3.4C) und etwa 39 kDa für PorB_{W135} (Abb. 3.4D) als auch den PorB_{W135}-Mutanten (Abb. 3.4E) festgestellt werden. Diese Werte entsprechen dem monomeren Molekulargewicht jedes einzelnen Porins. Obwohl die jeweiligen Größen anhand der SDS-PAGE-Analysen (Abb. 3.4) den einzelnen Porinen zugeordnet werden konnten, weichen die apparenten Molekulargewichte zum Teil leicht von den theoretischen Molekulargewichten ab (2.3.1), welche anhand der Aminosäuresequenz (A.8) mit dem Programm ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) berechnet wurden. Dieser Molekulargewichtsunterschied ist wahrscheinlich das Ergebnis einer unterschiedlichen Mobilität der Proteine, wobei diese Mobilität von der tatsächlichen Kompaktheit des Proteins im SDS-Gel abhängt. Die Kompaktheit wiederum wird determiniert durch die Effizienz der Abdeckung aller geladenen Seitenketten und ist auch abhängig von der vollständigen Denaturierung der Proteinsekundärstruktur, jeweils durch das Detergens SDS (Hjelmeland und Chrambach, 1984; Sallantin *et al.*, 1990).

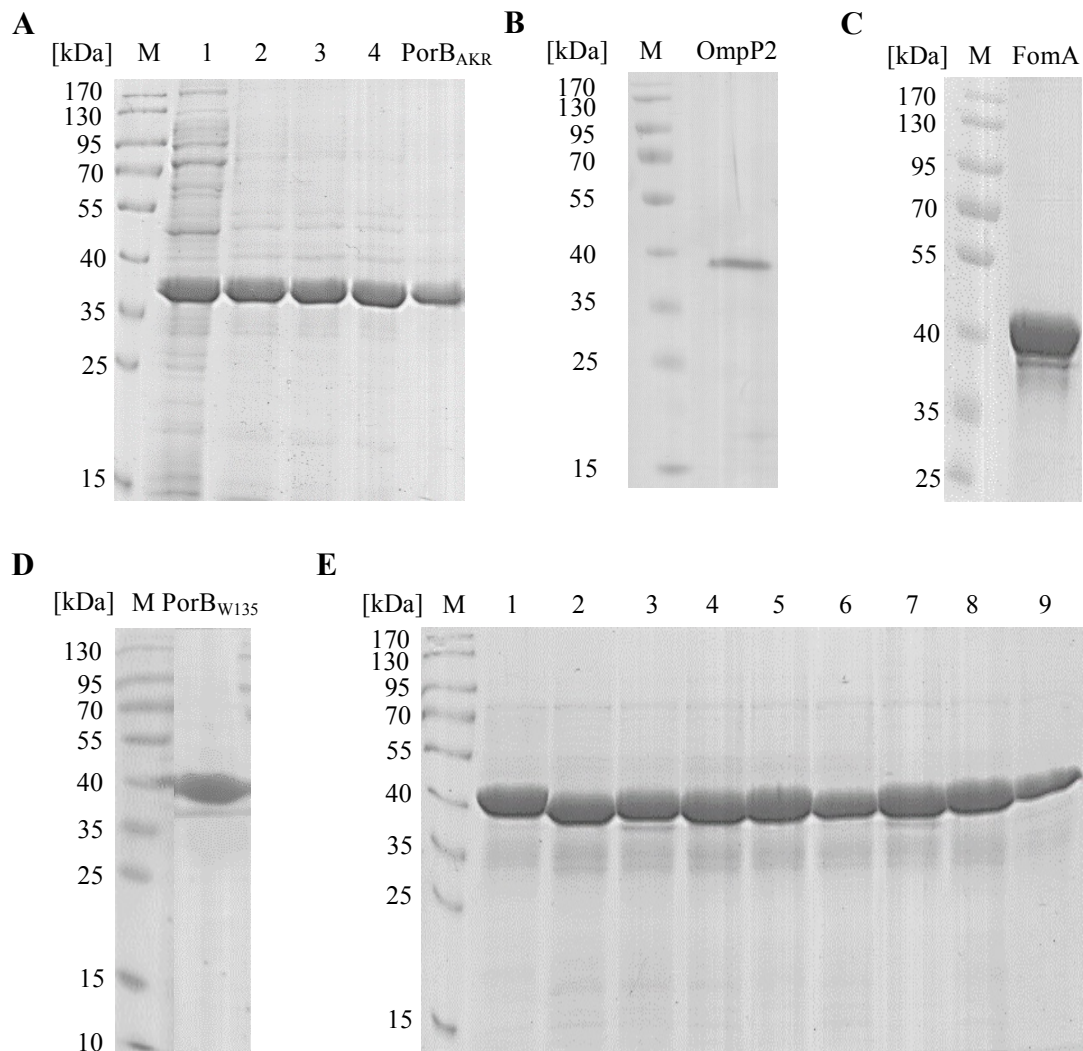


Abb. 3.4: SDS-PAGE-Analyse des Reinigungsverlaufes von PorB_B und Darstellung des finalen Reinheitsgrades weiterer verwendeter Porine nach erfolgter Proteinreinigung. M: Molekulargewichtsstandard. (A) PorB_B, 1: Zellsuspension nach Zellaufschluss. 2, 3: nach erstem und zweitem Waschritt. 4: nach SEC-Reinigung. PorB_{AKR} nach SEC-Reinigung. (B) OmpP2 nach SEC-Reinigung. (C) FomA nach SEC-Reinigung. (D) PorB_{W135} nach SEC-Reinigung. (E) PorB_{W135}-Mutanten jeweils nach SEC-Reinigung, 1: G103K. 2: G103D. 3: G103K_D104K. 4: G103F. 5: G103R. 6: G103E. 7: D101K. 8: G103M. 9: G103H.

Die entsprechenden Proteinbanden wurden nach der heterologen Überexpression und finalen Reinigung aus dem Gel extrahiert und einem proteolytischen Verdau unterzogen, wobei die resultierenden Peptide anschließend durch eine MALDI-TOF-TOF (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation und Flugzeitanalysator) Massenspektrometrie analysiert und durch Vergleich mit der jeweiligen Porin-Aminosäuresequenz identifiziert werden konnten. Obwohl für die Porinexpression ein Porin-defizienter BL21 (*DE3*)-Stamm verwendet wurde, konnte anhand der Massenspektrometrieanalyse jeweils eine Verunreinigung mit dem *E. coli*-

Porin OmpF in den aufgereinigten Proben festgestellt werden. Die Verunreinigungsrate hatte dabei stets einen Wert von weniger als 2% (FomA: 1,9%, OmpP2: 1,4%, PorB_B: 1,1%, PorB_{W135}: 1,9%). Das Expressions- und Aufreinigungsprotokoll war für alle Porine immer für eine IB-Konzentration optimiert, welche aus einem Schüttelkolbenvolumen von 400 ml-Medium generiert wurde. Trotz dieses für eine heterologe *E. coli*-Überexpression verhältnismäßig geringen Kulturvolumens, konnten für alle Genkonstrukte ausreichende Proteinmengen für Kristallisationsexperimente generiert werden. Allgemein betrachtet zeigten alle gereinigten Proteine eine hohe Reinheit und konnten somit für weitere biophysikalische und biochemische Charakterisierungen verwendet werden. Die jeweiligen Ausbeuten der durchgeführten 400 ml-Expressionen sind im Folgenden gezeigt (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Proteinausbeuten der Porin-Expressionen aus einem 400 ml-Kulturvolumen.

Protein	[mg]	Protein	[mg]
PorB _{W135}	10,5	PorB _{W135} G103M	10,9
PorB _{W135} G103D	7,9	PorB _{W135} G103H	10,4
PorB _{W135} G103K	3,5	PorB _{W135} D101K	8,8
PorB _{W135} G103E	10,0	PorB _{W135} G103K_D104K	9,8
PorB _{W135} G103R	10,9	PorB _B	6,5
PorB _{W135} G103F	9,8	PorB _{AKR}	6,3
PorB _{W135} G103H	10,4	FomA	1,4
PorB _{W135} G103M	10,9	OmpP2	3,03

3.1.3 Analyse der Sekundärstruktur nach Renaturierung

Um die erfolgte Renaturierung der Proteine zu bestätigen, sowie ausgebildete Sekundärstrukturen zu analysieren, wurden Fern-UV-CD-Messungen durchgeführt (Abb. 3.3). Gemäß Literatur (Nikaido, 2003) sollten die gereinigten Porine hauptsächlich β -Faltblattstrukturelemente aufweisen. Alle untersuchten Porine zeigten einen Kurvenverlauf mit einem Minimum bei 218 nm und einem Maximum bei 196 nm, welcher charakteristisch für das Vorhandensein einer von β -Faltblättern dominierten Sekundärstruktur ist (Abb. 3.5). Dabei konnten für PorB_{W135} und PorB_B ähnliche Amplituden festgestellt werden, die auf eine vergleichbare Sekundärstruktur hindeuten. Im Vergleich zu diesen Amplituden, zeigte OmpP2 und noch mehr FomA eine signifikante Intensitätszunahme am Minimum von 218

nm, was auf das Vorhandensein von mehr β -barrel Strukturelementen hindeuten könnte. Zusätzlich zu den renaturierten Porinen, wurde ebenfalls ein CD-Spektrum eines zuvor denaturierten Proteins vermessen (exemplarisch für FomA, inkubiert für 20 min bei 95°C). Dieses Signal unterschied sich von den renaturierten Porinen (Abb. 3.5) und zeigte bis 220 nm fast keine Intensitätsveränderung, was ein Hinweis auf das Fehlen von strukturierten Bereichen ist.

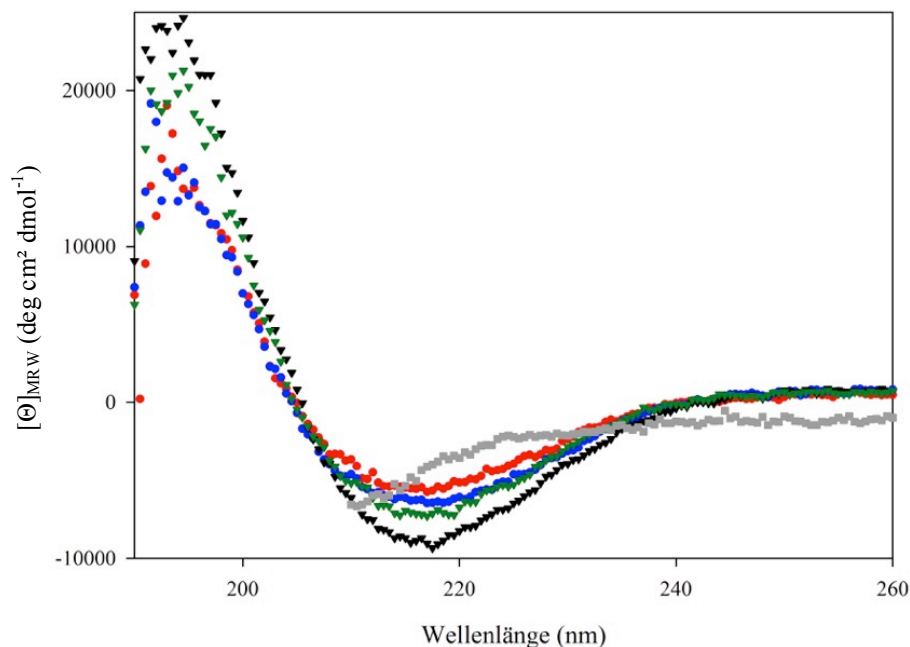


Abb. 3.5: Analyse der Sekundärstruktur der nativen Porine durch Fern-UV-Circulardichroismus. Die Spektren wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,1% LDAO in einer Küvette mit 1 mm Schichtdicke aufgenommen. PorB_B (●), PorB_{W135} (●), OmpP2 (▼), FomA (▼), denaturiertes Proteinspektrum (■). Die Proteinkonzentration betrug jeweils 1 mg/ml, gemessen bei 20°C.

3.2 PorB_{W135} aus *Neisseria meningitidis*

Biochemische Daten zeigen, dass Porinkanäle den Transport von kleinen löslichen Metaboliten durch Porenöffnung bzw. -schließung (*gating*) in Abhängigkeit des pH-Wertes regulieren können (Nikaido, 2003; Korkmaz-Ozkan *et al.*, 2010). Kristallstrukturen des Porins OmpG aus *E. coli* konnten beispielsweise bereits abhängig vom pH-Wert sowohl in der offenen als auch in der geschlossenen Konformation aufgeklärt werden (Abb. 1.3) (Yildiz *et al.*, 2006). Diese Konformationsänderung wurde aufgrund der bereits identifizierten *gating*-Funktion auch für das PorB_{W135} angenommen (Jadhev *et al.*, 2008, 2012). Aus diesem Grund sollten trotz der bereits aufgeklärten Struktur (Tanabe *et al.*, 2010) weitere Kristallisationsversuche zur Bestimmung noch nicht bekannter PorB_{W135}-

Kristallwachstumsbedingungen mit möglichen stark sauren oder stark basischen Puffern unternommen sowie *soaking*-Experimente bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt werden, um eine Strukturänderung als Folge des *gatings* näher charakterisieren zu können.

3.2.1 Proteinkristallisation

Wie bereits erwähnt, wurde das für die Proteinreinigung und Renaturierung verwendete Protokoll (Tanabe *et al.*, 2010) in dieser Arbeit neu etabliert und für jedes einzelne Porin optimiert. PorB_{W135} konnte in den bereits publizierten Bedingungen (Tanabe *et al.*, 2010) und den bereits bekannten Kristallformen und Raumgruppen (P6₃ und R32) kristallisiert werden. Es konnten Beugungsreflexe von bis zu 1,5 Å auf dem Detektor identifiziert werden, die nach Strukturauflösung durch molekularen Ersatz (Raumgruppe P6₃-3A2R als Suchmodel) und Verfeinerung zu einer insgesamt genaueren PorB_{W135}-Proteinstruktur mit einer maximalen Auflösung von 1,78 Å führten (Statistiken der Datensammlung und Strukturverfeinerung sind im Anhang A.6 dargestellt). Im Zusammenhang mit der Identifizierung der *gating*-Funktion in PorB_{W135} wurden diese Kristalle in Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten inkubiert, wobei zusätzlich auch neue Kristalle nach *screening* in Konditionen mit pH-Bereichen von 3,0-9,5 gezüchtet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Nach der Datenprozessierung und der nachfolgenden Strukturaufklärung konnten allerdings keine signifikante Konformationsunterschiede gesehen werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Kristallographische Identifizierung von Kationen im PorB_{W135}-Kanal

Obwohl eine Konformationsänderung des *loop 3* (L3) durch die in 3.2.1 beschriebenen Experimente nicht identifiziert werden konnte, wurden im Bereich der Kanalengstelle nahe L3 neue, bisher noch nicht beobachtete Elektronendichten (Abb. 3.6) sowohl in der R32- als auch in der P6₃-Kristallstruktur identifiziert (die Statistiken der Datensammlung und des *refinements* sind im Anhang A.2 aufgelistet). Während die Reservoirlösung 32% Jeffamin M-600, 0,1 M MES und 50 mM Cäsiumchlorid enthielt, war das Protein in einem Puffer aus 20 mM Tris-HCl, 200 mM Natriumchlorid und dem Detergens TDDG (0,1%) gelöst. Aufgrund der Form der Elektronendichte wurde davon ausgegangen, dass es sich dabei um Ionen handelt, welche aus den Puffern stammen, die während des Reinigungs- oder

Kristallisationsschrittes Verwendung fanden. Gleichwohl wurde das Cäsiumkation als die wahrscheinlichste Möglichkeit angenommen. Um die Präsenz von Cäsiumkationen zu bestätigen, wurden jeweils zwei Datensätze der Raumgruppe R32 sowie P6₃ bei einer Wellenlänge von 2 Å (Cs L-1 Absorptionskante liegt bei 2,17 Å) aufgenommen, in dessen Kristallstrukturen zuvor diese neuen Elektronendichten identifiziert wurden. Aus diesen Daten wurden im Anschluss „anomale“ Differenzelektronendichtemappen generiert (die Statistiken der Datensammlung und des *refinements* sind in A.3 aufgelistet).

Um das Signal-Rausch-Verhältnis aber auch Cäsiumkationen (Cs⁺) mit schwächeren Elektronendichten identifizieren zu können, wurden jeweils die anomalen Mappen der zwei Raumgruppen gemittelt (FFT; Immirzi, 1966). An den Positionen der zusätzlichen Elektronendichten konnten dabei starke, anomale Signale beobachtet werden, wodurch die Präsenz von Cs⁺ als auch ihre Bindung an den PorB_{W135}-Kanal bestätigt werden konnten. Bei der Überlappung der FoFc-Differenzelektronendichtekarte mit der anomalen Elektronendichtekarte wurden an diese Positionen Cs⁺-Ionen gesetzt, wobei zwei zusätzliche Cs⁺-Ionen identifiziert wurden. Diese Ionen sind in Abb. 3.6 aufgeführt und von Cs1 bis Cs4 nummeriert. Die hauptsächliche Interaktion von Cs1 erfolgte mit den Sauerstoffatomen der Carbonylgruppen der Aminosäuren G125 und E128 mit einer Distanz von 3,0 - 3,2 Å (Abb. 3.7A). Darüber hinaus sind elektrostatische Interaktionen mit den negativ geladenen Seitenketten von E116 und E202, induziert durch Wassermoleküle, möglich. Zusätzlich könnte eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Cs1 und der Carbonylgruppe von G122 durch das Wassermolekül 554 vermittelt werden. Das Cäsiumkation Cs2 ist am Ende von L3, nahe der extrazellulären Seite der β-Fasstruktur positioniert (Abb. 3.6). Dabei erfolgte eine Interaktion mit dem Carbonylsauerstoffatom von R130 mit einer Entfernung von 2,8 – 3,0 Å (Abb. 3.7A). Eine schwache Interaktion von Cs2 mit der Carboxylatgruppe der Seitenkette von E131, mit einer Distanz von 3,4 – 3,6 Å, ist ebenfalls möglich.

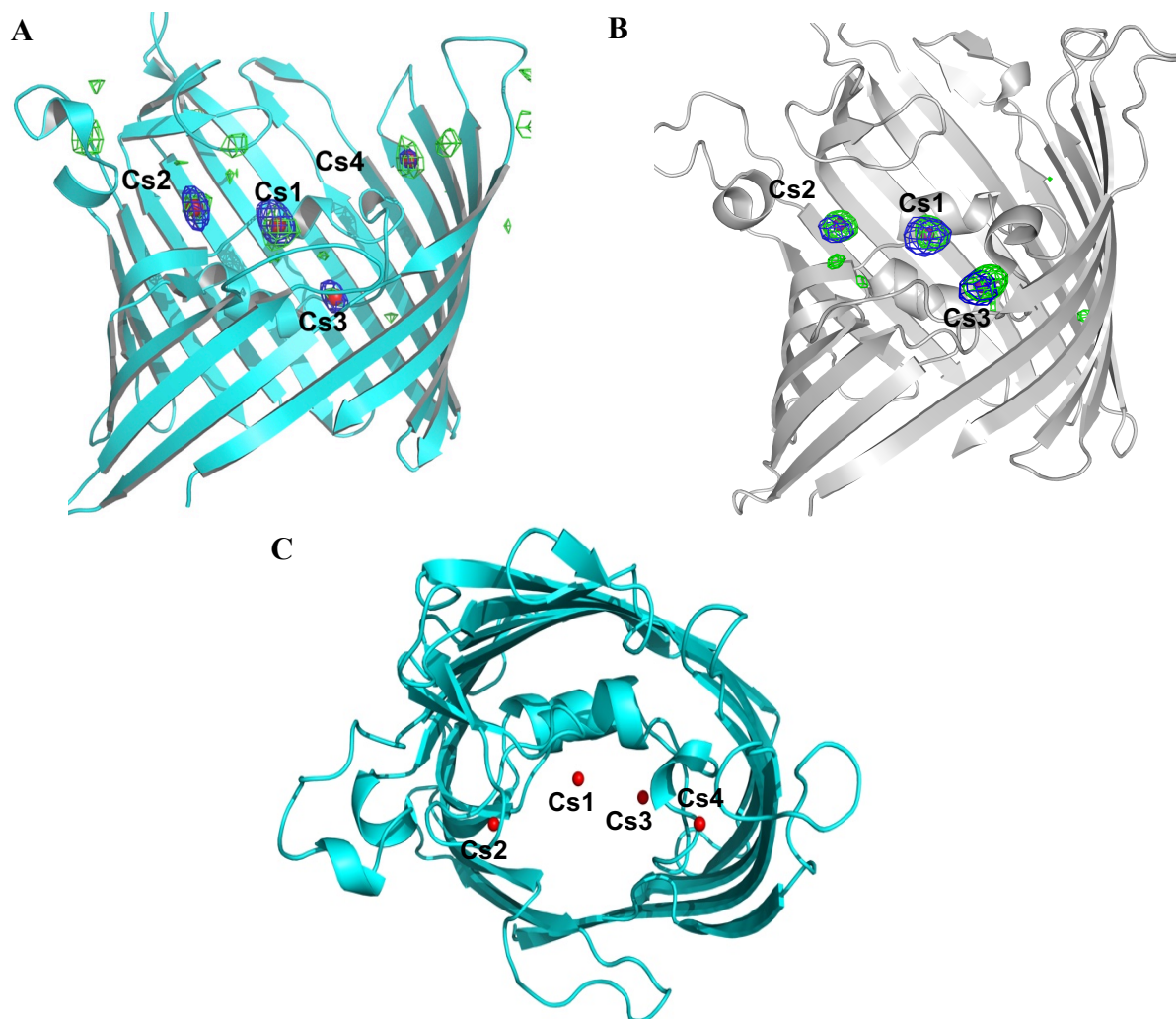


Abb. 3.6: Darstellung der identifizierten Cäsiumionen. Die *cartoon*-Darstellung zeigt das PorB_{W135}-Molekül der (A) Raumgruppe R32 in cyan (mit vier Cs⁺-Ionen als rote Kugeln) und der (B) P6₃ Raumgruppe in grau (mit drei Cs⁺-Ionen als lila Kugeln) von der Membranseite mit der FoFc-Differenzelektronendichtekarte (+3 σ , grünes Gitter) und der gemittelten anomalen Elektronendichtekarte (+5 σ , blaues Gitter). (C) Von der extrazellulären Seite sind die vier Cs⁺-Ionen der Raumgruppe R32 dargestellt.

Drei Wassermoleküle sind in direkter (4 Å) Umgebung von Cs3 positioniert und könnten gleichermaßen zu seiner Koordination beitragen (Abb. 3.7B). Die Position von Cs3 ist ebenfalls nahe L3, allerdings ist Cs3 im Vergleich zu Cs2 mehr zur Periplasmaseite orientiert. Die Cs3-Position ist in den Kristallen der Raumgruppen R32 und P6₃ zwar nah beieinanderliegend, allerdings ist die Position in P6₃ etwas mehr zur extrazellulären Seite verschoben (Abb. 3.7B). In der Raumgruppe P6₃ ist mit einem Abstand von 1,5 Å von der R32-Cs3-Position ein Wassermolekül positioniert. Die Interaktion erfolgte in R32 über die Carbonylgruppe von W109 und der negativen Seitenkette von E110. Wasserinduzierte elektrostatische Interaktionen mit N107 sind denkbar. Im Kristall der Raumgruppe P6₃ ist Cs3

wiederum nur über Wassermoleküle mit der Carbonyl- und der Hydroxylgruppe von S111 koordiniert (Abb. 3.7B). Das Cäsiumkation Cs4 konnte durch kristallografische Untersuchungen nur in Kristallen der Raumgruppe R32 identifiziert werden und ist nahe L3 an der extrazellulären Seite positioniert (Abb. 3.7C). Mit einem Abstand von 1 Å von der R32-Cs3-Position ist ein Wassermolekül in der Raumgruppe P6₃ positioniert. Die Entfernung von 3,6 – 4,2 Å zu benachbarten Seitenketten von N114 und Q330 sowie der Carbonylgruppe von N114, lassen auf nur schwache elektrostatische Wechselwirkungen schließen. Der Vergleich von Resten in direkter Umgebung der Cs-Kationen sowie derer in den Raumgruppen R32 und P6₃ (Gesamt-molekül) zeigten keine signifikanten Strukturänderungen.

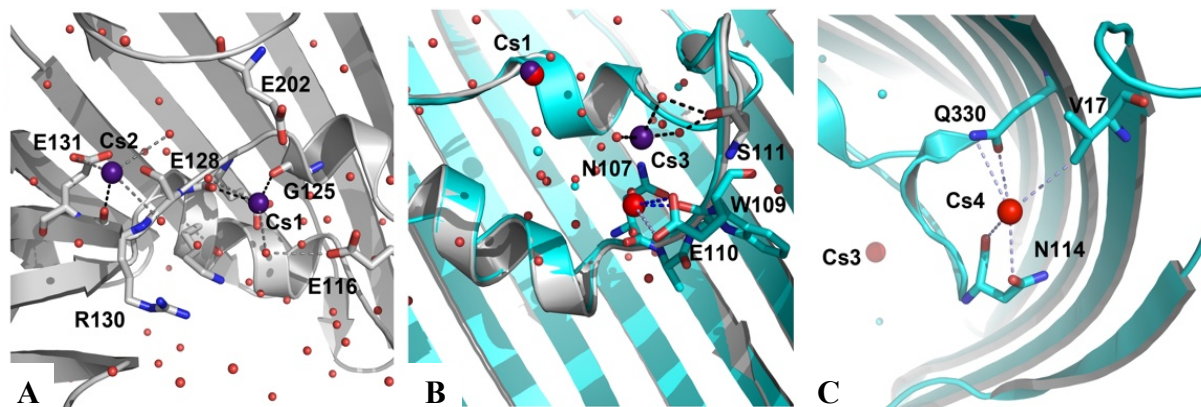


Abb. 3.7: Darstellung der Interaktion zwischen PorB und Cs⁺. (A) Wechselwirkungen von Cs1 und Cs2 im Kristall der Raumgruppe P6₃ (Cs⁺ sind lila, Wassermoleküle rosa und PorB grau dargestellt). (B) Die Koordinierung von Cs1 und Cs3 im R32- (Cs⁺ rot, Wassermoleküle rosa und PorB cyan) und P6₃-Kristall (Cs⁺ lila, Wassermoleküle rosa und PorB grau) ist dargestellt. Dabei unterscheidet sich die Position von Cs3 in den Kristallen der Raumgruppen P6₃ und R32. (C) Zusätzlich ist die Interaktion von Cs4 im R32-Kristall gezeigt (Cs4 in rot). In allen Abbildungen sind stärkere Interaktionen (2,8 - 3,2 Å) durch schwarze und schwächere Interaktionen (3,2 – 4 Å) durch graue Striche gekennzeichnet.

3.2.3 Moleküldynamische Studien des Ionentransportes im PorB_{W135}-Kanal

Zusätzlich zur Aufnahme des anomalen Signals zur Identifizierung der Cs⁺-Positionen in der Kristallstruktur, wurden in diesem Zusammenhang Computersimulationen der Moleküldynamik (MD) aufgenommen (durchgeführt von Ulrich Zachariae, University of Dundee). Durch die Aufnahme von sog. Energiekarten (*potential of mean force*, PMF), welche die möglichen Positionen der Ionen im Kanal aufzeigen, sowie der Lokalisation der Ionenkontakte (Kontaktanalyse), sollte die Interaktion zwischen dem PorB-Molekül und den Cäsiumionen analysiert werden. Dafür wurde die P6₃-PorB-Struktur in ein vollständig

hydratisiertes Membranmodell einer Lipiddoppelschicht aus 367 Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)-Einheiten integriert. Zur Aufnahmeverbesserung wurde eine Hochsalzkonzentration von 1 M Cäsiumchlorid gewählt, was jeweils 820 Cs^+ - und Cl^- -Ionen entspricht. Damit die Membran in flüssiger Phase verbleibt, wurde das System bei einer Temperatur von 320 K und 1 bar simuliert. Für die Aufnahme der Energiekarten wurde eine 100 ns-Äquilibriumsimulation des Systems mit drei Kanälen (jeweils für drei PorB-Monomere) durchgeführt, wobei Datensätze aus allen drei Kanälen kombiniert wurden. Die Analyse der Ionenkontakte mit Cäsium und den Wassermolekülen, wurde durch die Überprüfung der Cäsiumpräsenz in jedem Kanal in 40 ps-Zeitperioden innerhalb einer 6 Å-Umgebung der PorB-Reste bestimmt. Der Vergleich der PMF für Cl^- - und Cs^+ -Ionen zeigte, dass beide Ionenarten unterschiedliche Wege entlang eines Clusters von gegensätzlich geladenen Resten innerhalb des PorB-Kanals nahmen (Abb. 3.8). Dabei zeigten die Simulationen für Cs^+ einen Hauptbindebereich, welcher sich im extrazellulären Vorraum zwischen L3 und L5 befindet, mit dominanten Interaktionen von E116, D117, D200 und E202 (Abb. 3.9A). Diese Region beinhaltet die kristallografisch identifizierten Kationen Cs1, Cs3 und Cs4, nicht aber Cs2. Im Bereich möglicher Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten E128 und E131 (diese koordinieren Cs2), konnten in den Simulationen nur Wassermoleküle beobachtet werden.

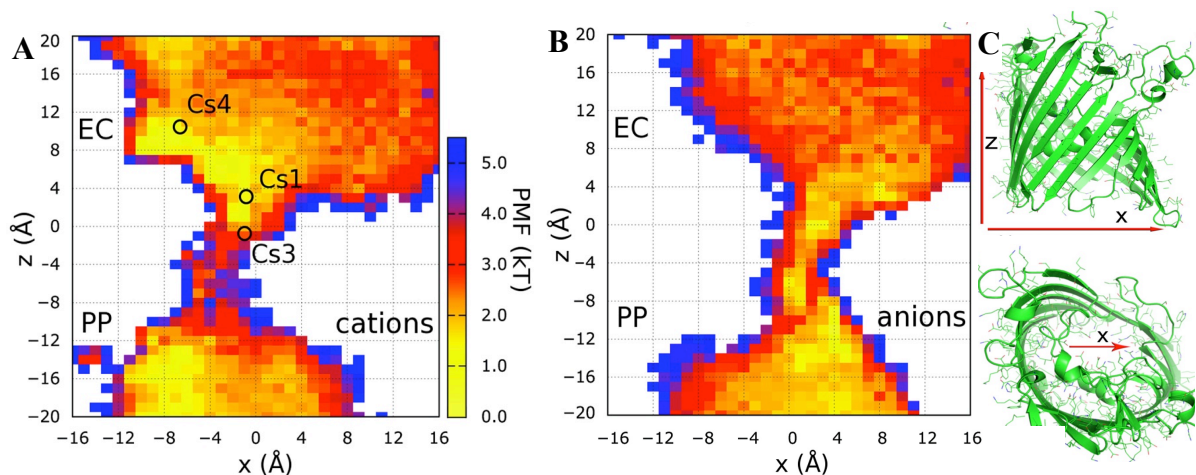


Abb. 3.8: Moleküldynamikanalyse von Ionen im PorB-Kanal. Der extrazelluläre Vorraum (EC) und periplasmatische Vorraum (PP) sind markiert. Gezeigt sind die PMF-Karten für jeweils 1 M (A) Cs^+ -Kationen und (B) Cl^- -Anionen. Dabei ist die PMF als Farbcode mit gelb (0 kT, Energieminimum) nach blau (>5 kT, Energiemaximum), relativ zur niedrigsten freien Energie gekennzeichnet. Die Positionen der kristallografisch identifizierten Cs^+ sind durch schwarze Ringe gezeigt. (C) Achsen zur Darstellung der PMF-Karten sind angegeben.

Die Belegung mit Cs^+ zeigte nur vernachlässigbare Werte (Abb. 3.9A). Die zweite Hauptbinderegion für Cs^+ war im periplasmatischen Vorraum, mit einem Bereich von D104

(L3) bis D227 am periplasmatischen Ende des β -Faltblatt β 10 (Abb. 3.9A). Es konnte beobachtet werden, dass Cäsium-Kationen im Vergleich zu Chlorid-Anionen eine stärkere Energiebarriere überwinden müssen, um durch die PorB-Engstelle zu fließen, welche die zwei bevorzugten Binderegionen verbindet. Wie bereits erwähnt, wurden auch kurz-andauernde Interaktionen (40 ps) zwischen dem Molekül und den Ionen simuliert. Dabei konnte das Ergebnis der PMF-Karten bestätigt werden, wobei der Großteil der lang-andauernden Interaktionen tatsächlich in den internen *loop*-Bereichen, hauptsächlich am L3 und L5, erfolgten (Abb. 3.9A). Die Aminosäuren E116, D117, D200 und E202 waren weitestgehend in allen drei Kanälen (ein Kanal entspricht dabei einem Monomer) mit Cs^+ besetzt und stimmten mit den kristallografisch identifizierten Positionen von Cs1 und Cs3 gut überein. Die Interaktionen zwischen Cs1 und der Carbonylgruppe von G122 und E128 konnten in den Simulationen ebenfalls identifiziert werden, wobei die stärkste Interaktion jedoch von der Carbonylgruppe R126 ausging. Im Fall von Cs4 bestand die dominierende Interaktion mit T123 und Q321, während E116 hauptsächlich als Interaktionspartner von Cs3 zu finden war. Eine signifikante Interaktionsstelle für Cs2 konnte weder in der Energiekarte noch in der Kontaktanalyse gefunden werden. Die in Abb. 1.6C gezeigten, strikt separierten Flusswege für Anionen und Kationen konnten bereits für NaCl beobachtet werden (Kutzner *et al.*, 2011), wobei mit Cäsiumchlorid ein noch höheres Teilungsmaß erzielt wurde, welches aus der starken Energiebarriere resultierte (Abb. 3.9B). Dies wiederum ist eine direkte Folge der Existenz spezifischer Cäsiumbindestellen sowohl in den Simulationen als auch in den Kristallstrukturen.

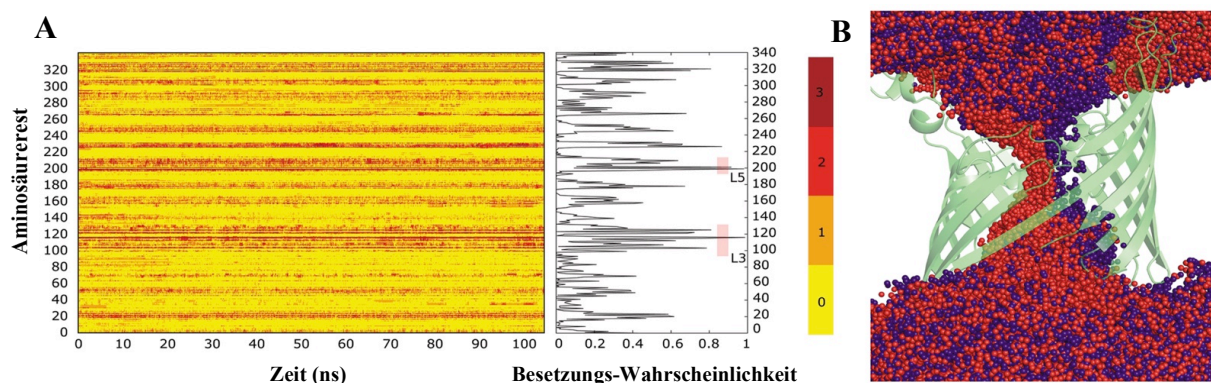


Abb. 3.9: MD-Kontaktanalyse und Überlagerung von Cs^+ - und Cl^- -Ionen im PorB-Kanal. (A) Darstellung der Interaktionen zwischen Cs^+ und PorB-Seitenketten. Dabei entspricht Gelb keiner Belegung in den Kanälen, Orange einer Belegung in einem Monomer, Rot in zwei Monomeren und Braun in drei Monomeren. Die Aminosäuren E117, D200 und E202 sind nahezu kontinuierlich (mehr als 90% der simulierten Zeit) in allen drei Monomeren mit Cs^+ besetzt. L3 und L5 sind durch hellrote Balken hervorgehoben. (B) Die Cs^+ - (lila) und Cl^- - (rot) Verteilung im PorB-Kanal ist von der Membranseite gezeigt.

3.2.4 Antibiotikatransport in PorB_{W135}-Mutanten

Um ein besseres Verständnis über Auswirkungen von spezifischen Aminosäureaustauschen auf die Antibiotikaresistenz in PorB_{W135} zu erhalten (1.3.1.4), wurde der Antibiotikatransport in PorB_{W135}-G103-Mutanten analysiert. Abbildung 3.10 zeigt einen Porin-Sequenzvergleich homologer PorB-Sequenzen aus N_{lac}, N_{gon} und verschiedenen Serogruppen von N_{men}. Dabei ist die Position 103 hoch konserviert, was eine wichtige Bedeutung dieser Position im Antibiotikatransport vermuten lässt. Es zeigt sich die typisch ausgeprägte Identität innerhalb der β -Faltblätter, während die *loop*-Regionen (mit Ausnahme von L2 und L8) weitestgehend Diversität aufweisen.

PorBW135		QVTTYGTIKAGVEVSRVKDAGTYKAQGGKSKTATQIADFGS	41
PorBSeroA		DVTTYGTIKTGVE ^T SR ^S --VEHNGGQVVSVE ^T GTG ^I VDLGS	
PorBSeroC		DVTTYGTIKTGVE ^T SR ^S --VYEDGKAAEVT ^T GTG ^I VDLGS	
PorBSeroB		DVTTYGTIKAGVE ^T SR ^S --VFHQNGQVTEVT ^T ATG ^I VDLGS	
PorBGon		DVTTYGTIKVGVET ^F SR ^S --VAYHGAQADR ^V KTATE ^I ADLGS	
PorBLac		DVTTYGTIKAGVE ^T YRT ^T --VKHTDGKVTEVKT ^G SE ^I ADFGS	
		β1 L1 β2 β3	
PorBW135	42	KIGFKGQEDLGNGMKAIWQLEQKASIAGTNSG ^W GNRQ ^S FIGLKG ^G FGTV ^R AGNL ^N TVLKD	101
PorBSeroA		KIGFKGQEDLGNGL ^K KAIWQ ^V EQKASIAGT ^D SG ^W GNRQ ^S FIGLKG ^G FGK ^L RVGRL ^N SVLKD	
PorBSeroC		KIGFKGQEDLGNGL ^K KAIWQ ^V EQKASIAGT ^D SG ^W GNRQ ^S FIGLKG ^G FGK ^L RVGRL ^N SVLKD	
PorBSeroB		KIGFKGQEDLGNGL ^K KAIWQ ^V EQKASIAGT ^D SG ^W GNRQ ^S FIGLKG ^G FGK ^L RVGRL ^N SVLKD	
PorBGon		KIGFKGQEDLGNGL ^K KAIWQ ^V EQKAYVSG ^T LE ^G WGNRQ ^S FIGLKG ^G FGK ^V RVGRL ^N SVLKD	
PorBLac		KIGFKGQEDLGNGL ^K KAIWQ ^L EQNASIAGT ^D SG ^W GNKQ ^S FIGLKG ^G FGTV ^R AGNL ^N SILKS	
		β4 β5 L2 β6 β7	
PorBW135	102	SGDNVNAWESGSNTEDVLGLGTIGR ^V ES ^R EISVRYDSPV ^F AG ^F SGSVQYV ^P RDND ^V DK	161
PorBSeroA		TGD-INP ^W DS---KSDYLGVN ^K IAEP ^E ARLI ^S VRYDSP ^E FAG ^L SGSVQY ^A LN ^D NV----	
PorBSeroC		TGD-INP ^W DS---KSDYLGVN ^K IAEP ^E ARLI ^S VRYDSP ^E FAG ^L SGSVQY ^A LN ^D NA----	
PorBSeroB		TGD-INP ^W DS---KSDYLGVN ^K IAEP ^E ARLI ^S VRYDSP ^E FAG ^L SGSVQY ^A LN ^D NA----	
PorBGon		TGG-FNP ^W EG---KSYLGLSN ^I GAPE ^R HVSVRYDSP ^E FAG ^F SGSVQY ^V PND ^N S----	
PorBLac		TGDNVNAWESGKATEDVLQVSKIGAP ^E HR ^Y ASVRYDSP ^E FAG ^F SGSVQY ^A PKDN ^S ----	
		L3 β8 β9 L4	
PorBW135	162	YKHTKSSR ^E SYHAG ^L KYENAG ^F FGQYAG ^S FAKYADLNTDAERVAVNTANAH ^P VKDY ^Q VHR	221
PorBSeroA		---GRHNS ^E SYHAG ^F NYKNG ^G FFVQY ^G GAYKR ^H HQD-----VDD-VKIEKY ^Q IHR	
PorBSeroC		---GRHNS ^E SYHAG ^F NYKNG ^G FFVQY ^G GAYKR ^H HER-----VDKVN ^I IEKY ^Q IHR	
PorBSeroB		---GRHNS ^E SYHAG ^F NYKNG ^G FFVQY ^G GAYKR ^H HQ-----VQEGL ^N IEKY ^Q IHR	
PorBGon		---GKNHS ^E SYHAG ^F NYKNS ^G FFVQY ^A GSYKR ^H -----NFTTEKH ^Q VHR	
PorBLac		---GK-NG ^E SYHVGLNY ^Q NSG ^F FAQYAG ^L FQRH ^G EG-----TKATV ^G EPVEK ^L QVHR	
		β10 β11 L5 β12	
PorBW135	222	VVAGYDANDLY ^V SVAG ^Q YEA ^A KNNEVGSIKGKKHE ^Q TQVAATA ^A YRFGNVT ^P RVSYAHGF	281
PorBSeroA		LVSGYDNDALY ^A SVAV ^Q QD ^A KLVE----DNSHNS ^Q TEVAAT ^L AYRFGNVT ^P RVSYAHGF	
PorBSeroC		LVSGYDNDALY ^A SVAV ^Q QD ^A KLALP--NDNSHNS ^Q TEVAAT ^V AYRFGNVT ^P RVSYAHGF	
PorBSeroB		LVSGYDNDALY ^A SVAV ^Q QD ^A KLTD--ASNSHNS ^Q TEVAAT ^L AYRFGNVT ^P RVSYAHGF	
PorBGon		LVGGYDHDALY ^A SVAV ^Q QD ^A KLTD--ASNSHNS ^Q TEVAAT ^A AYRFGNVT ^P RVSYAHGF	
PorBLac		LVGGYDNDALY ^A SVAV ^Q QD ^A KLTD--ASNSHNS ^Q TEVAAT ^V AYRFGNVT ^P RVSYAHGF	
		β13 L6 β14 β15	
PorBW135	282	KAKVNGVKDANY ^Q YDQVIVGADYDF ^S KRTSALVSAGWL ^K Q ^G GKAGKVE ^Q TASMVGLR ^H KF	341
PorBSeroA		KGSVDDAKRDN-TYDQVVVGA ^E YDF ^S KRTSALVSAGWL ^Q E ^G GKENK ^F VATAGGVGLR ^H KF	
PorBSeroC		KGSVDDAKRDN-TYDQVVVGA ^E YDF ^S KRTSALVSAGWL ^Q E ^G GKENK ^F VATAGGVGLR ^H KF	
PorBSeroB		KGLVDDADIGN-EYDQVVVGA ^E YDF ^S KRTSALVSAGWL ^Q E ^G GKENK ^F VATAGGVGLR ^H KF	
PorBGon		KGSVYDADNDN-TYDQVVVGA ^E YDF ^S KRTSALVSAGWL ^Q R ^G GKTEK ^F VATVGGVGLR ^H KF	
PorBLac		KGTVAKADGDN-RYDQVVVGA ^E YDF ^S KRTSALVSAGWL ^Q E ^G GKAGK ^T VSTASTVGLR ^H KF	
		L7 β16 β17 L8 β18	

Abb. 3.10: PorB-Sequenzalignment. PorB-Sequenzen aus N_{gon}, N_{lac} und N_{men} Serogruppe W135, A, B, C wurden mit ClustalW2 (Larkin *et al.* 2007) auf Homologie untersucht. Identische Aminosäuren sind fett markiert. Zusätzlich sind die Positionen der β -Faltblätter (β 1- β 18) und der *loops* (L1-L8) gezeigt. Die Lage von G103 ist rot hervorgehoben.

Aufgrund der immer weiter fortschreitenden Resistenz der *Neisseria*-Stämme gegen die Antibiotika Penicillin und Ampicillin (Abb. 3.11), wurden mit ihnen die Analysen des Antibiotikatransportes durchgeführt.

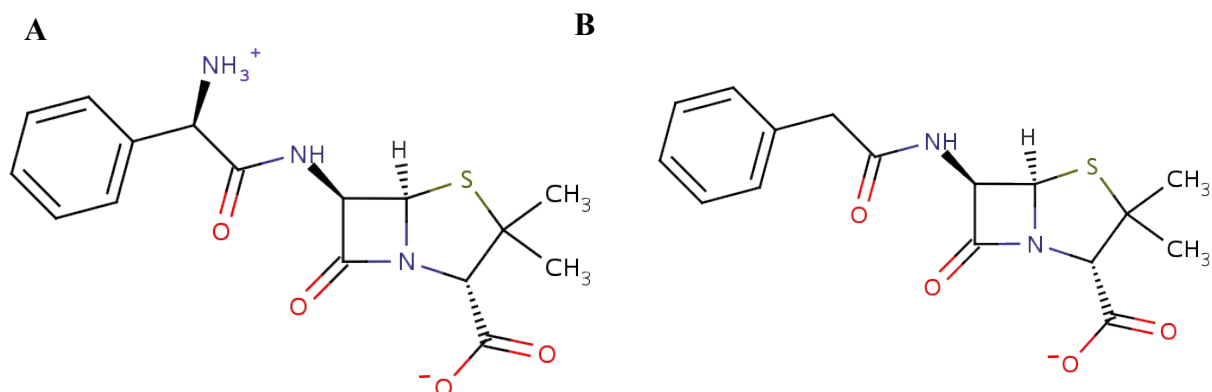


Abb. 3.11: Molekülstruktur der eingesetzten Antibiotika. (A) Das zwitterionische Ampicillin-Molekül trägt ein starkes Dipolmoment mit einer positiv geladenen Aminogruppe (NH_3^+) und einer negativ geladenen Carboxylatgruppe (COO^-). (B) Das einfach negativ-geladene Penicillin G unterscheidet sich vom Ampicillin lediglich durch das Fehlen der Aminogruppe (NH_3^+).

Um den Einfluss der spezifischen Aminosäure G103 auf den Antibiotikatransport näher zu charakterisieren, wurden zwei G103-Mutanten (G103K und G103D) generiert, die besonders häufig in PorB-Porinen resistenter *Neisseria*-Stämme auftraten (Olesky *et al.*, 2002). Sie sollten Hinweise bezüglich der Antibiotikaresistenz geben und einen Vergleich mit den diskutierten PorB Mutationen aus N_{gon} ermöglichen (Olesky *et al.*, 2002, 2006). Die Position dieser beiden Reste im Wildtyp-PorB_{W135} ist in Abb. 3.12 gezeigt.

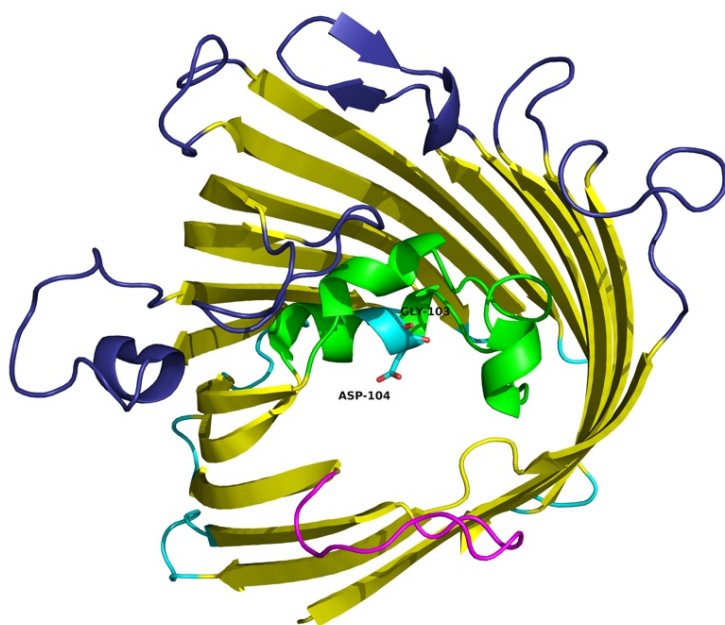


Abb. 3.12: Position von Gly103 im PorB_{W135}-Kanal. Gezeigt ist die Lage von Gly103 und Asp104 (C-Atome cyan, O-Atome rot) im L3 (in grün) innerhalb des PorB_{W135}-Kanals.

Für die Analyse wurden beide Porine in multilamellare Liposomen rekonstituiert und ein Schwellungsassay durchgeführt (Nikaido und Rosenberg, 1983; Yoshimura *et al.*, 1983). Dieser beruht darauf, dass nach Inkubation der Proteoliposomen in Lösungen mit einer isoosmotischen Antibiotikakonzentration aufgrund des Konzentrationsgefälles ein messbarer Wasserfluss in die Liposomen eintritt, welcher äquivalent zum Antibiotikatransport steht (2.5). Es erfolgt ein Platzen der Liposomen, sodass die optische Dichte (Messung bei 400 nm) mit der Zeit und zunehmendem Transport abnimmt.

In initialen Versuchsdurchführungen hat sich herausgestellt, dass die Tetrazyklinlösung durch eine eigene Lichtabsorption das Signal überdeckte und somit in den folgenden Analysen nicht verwendet werden konnte. In allen durchgeführten Messungen wurden stets Liposomen ohne inkorporierte Porine (Negativkontrolle) mitgeführt und ebenfalls mit allen analysierten Antibiotika vermessen. Um einheitliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, erfolgten die Herstellung der Proteoliposomen sowie die Durchführung des Assays durchgehend unter gleichen Bedingungen. Die isoosmotische Konzentration wurde für jeden neu angesetzten Versuch empirisch durch Inkubation der Liposomen ohne eingebettete Porine (Kontrolle) mit unterschiedlich konzentrierten Antibiotikallösungen ermittelt. Je mehr die vorliegende Konzentration der isoosmotischen Konzentration ähnelte, umso geringer war ein Anschwellen der Liposomen, einhergehend mit einem konstanten Absorptionssignal. Mit dieser Konzentration wurden anschließend die G103-Mutanten vermessen (Abb. 3.13).

Generell konnte festgestellt werden, dass Penicillin G im Vergleich zu Ampicillin besser transportiert wurde. Das gilt sowohl für den Wildtyp als auch für die beiden Mutanten. Zusätzlich zeigte sich ein deutlich reduzierterer Fluss in beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Der Transport von Ampicillin und Penicillin G wurde im Falle der Lysin-Mutation (G103K) stärker inhibiert als durch die Aspartat-Mutation (G103D). Während der Austausch des Aspartates den Transport von Ampicillin im Vergleich zum Wildtyp um etwa 25% und Penicillin G um etwa 17% reduzierte, waren die Durchflussraten für die Lysin-Mutation mit 50% (Ampicillin) bzw. 42% (Penicillin G) deutlicher herabgesetzt.

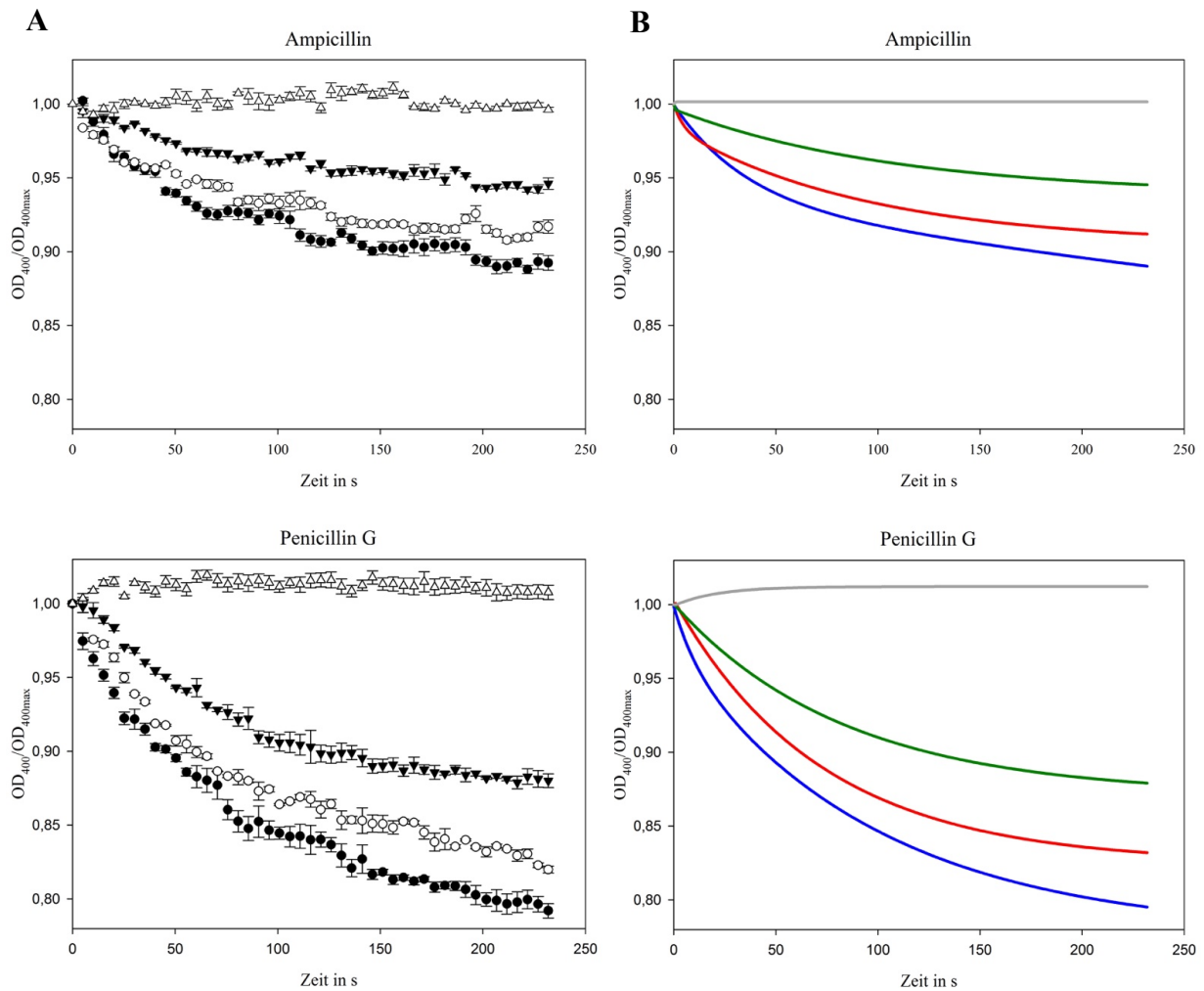


Abb. 3.13: Antibiotikatransport in PorB_{W135} G103D und G103K. Die durch den Transport von Antibiotika induzierte Schwellung der PorB-Proteoliposomen, wird nach Verdünnung in eine 15 mM Antibiotika-StammLösung (jeweiliges Antibiotikum ist angegeben) in Abhängigkeit der Absorptionsintensität bei 400 nm dargestellt. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. **(A)** Rohdaten. **(B)** Angepasste Kurven nach exponentieller Annäherung. Wildtyp (●/—), G103D (○/—), G103K (▼/—), Kontrolle mit PorB-freien Liposomen (Δ/—).

Mit den Analysen der Varianten G103K und G103D konnte der Einfluss der Position 103 im Transport von Antibiotika belegt werden. Um weitere Hinweise für den verringerten Antibiotikatransport zu finden, wurden weitere Analysen durchgeführt, um mögliche sterische oder elektrostatische Einflüsse als Erklärung für den verringerten Antibiotikatransport zu identifizieren (Abb. 3.14).

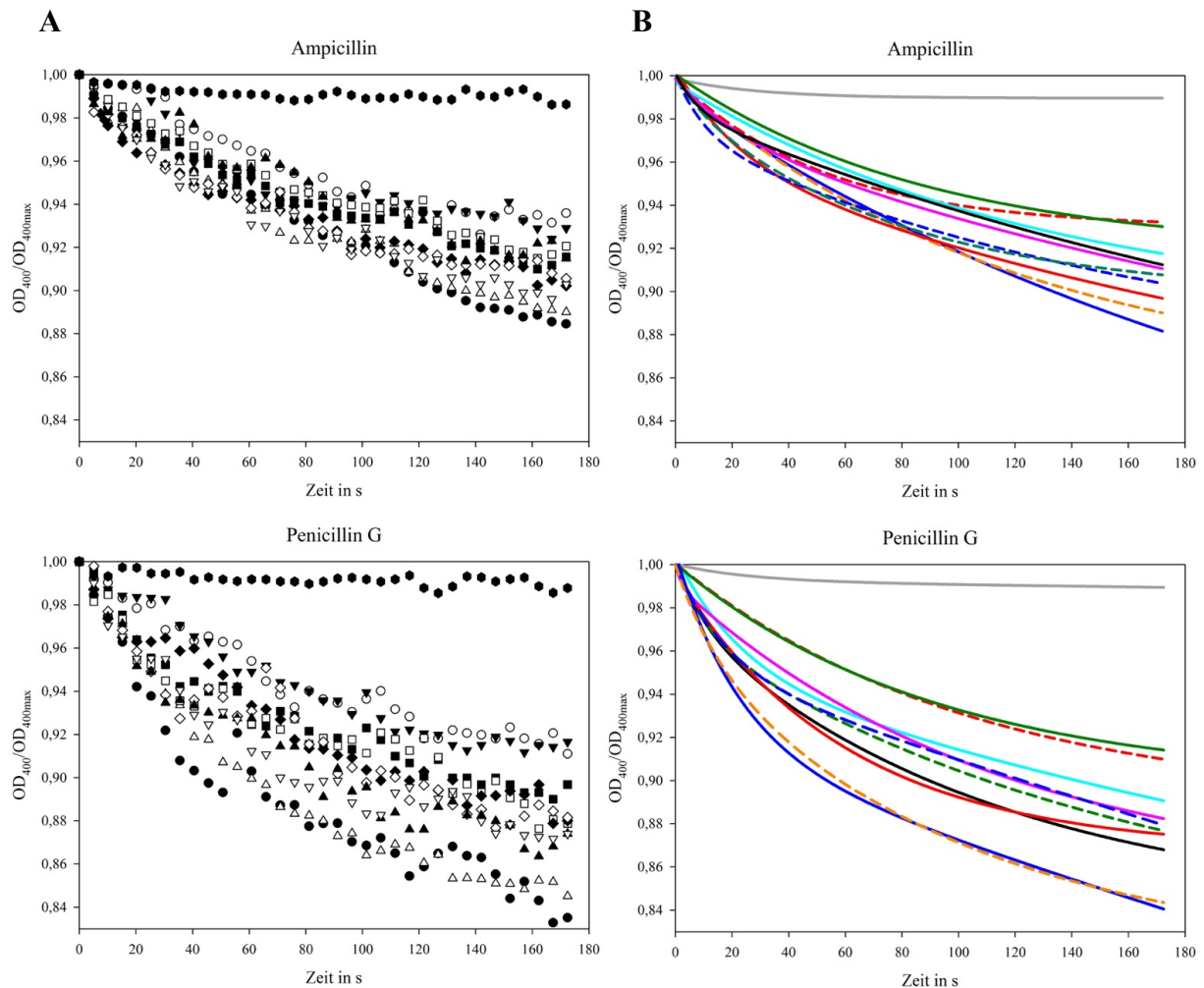


Abb. 3.14: Antibiotikatransport in PorB_{W135}-Mutanten. Die durch den Transport von Antibiotika induzierte Schwellung der PorB-Proteoliposomen, wird nach Verdünnung in eine 15 mM Antibiotika-Stammlösung (jeweiliges Antibiotikum ist angegeben) in Abhängigkeit der Absorptionsintensität bei 400 nm dargestellt. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. **(A)** Rohdaten. **(B)** Angepasste Kurven nach exponentieller Annäherung. Wildtyp (●/—), G103K (○/—), G103R (▼/---), D101K (Δ/---), G103E (■/—), G103M (□/—), G103K_D104K (◆/---), G103H (◇/---), G103F (▲/—), G103D (▽/—), Kontrolle mit PorB-freien Liposomen (●/—).

Wie bereits in der Transportanalyse von G103D und G103K (Abb. 3.13), stellte sich wieder ein besserer Durchfluss von Penicillin G im Vergleich zu Ampicillin ein (Abb. 3.14). Des Weiteren konnten alle getesteten Mutationen der Position 103 den Transport für beide Antibiotika inhibieren, wodurch ein Einfluss dieses Restes im Transport von Antibiotika nochmals gezeigt werden konnte. Da die Mutation von D101 gegen eine lange Lysinseitenkette (D101K) keine Inhibierung des Antibiotikatransports verursachte, könnte davon ausgegangen werden, dass diese Stelle wahrscheinlich nicht direkt im Antibiotikatransportweg liegt und somit wenig Einfluss auf die Translokation hat. Generell

bewirkte der Austausch von langkettigen basischen Aminosäuren (G103K und G103R) eine ähnlich maximale Reduzierung des Transportes. Beide Mutanten transportierten die getesteten Antibiotika nur mit der Hälfte der Transporteffizienz (50%) vom Wildtyp. Ein doppelter Austausch gegen Lysin an den Positionen 103 und 104 (G103K_D104K) führte nicht zu einer noch größeren Inhibierung im Vergleich zur einfachen Lysin-Mutation (G103K). Die Doppelmutante (G103K_D104K) hatte eine geringere Transporteffizienz im Vergleich zum Wildtyp (Ampicillin 17%, Penicillin G 23%). Die Durchflusswerte für die Mutationen G103E und G103M lagen für beide Antibiotika im nahezu gleichen Inhibierungsbereich (26-30%). Die geringste Inhibierungseffizienz (mit Ausnahme von D101K) zeigten G103H, G103D und G103F mit etwa 14-20%.

3.2.5 Zuckertransport in PorB_{W135}-Mutanten

Um zu überprüfen, ob die Mutationen an Position 103 möglicherweise auch Einfluss auf den Zuckertransport hatte, erfolgten Transportmessungen in allen PorB_{W135}-G103-Mutanten mit verschiedenen Mono- und Disaccharidlösungen (Glukose, Galaktose, Maltose, Saccharose). In Abbildung 3.15 ist exemplarisch der Transport von Glukose und Maltose in den Varianten G103K, G103D und G103M im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Diese PorB-Varianten (wie auch die restlichen Mutanten) zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Transporteffizienz.

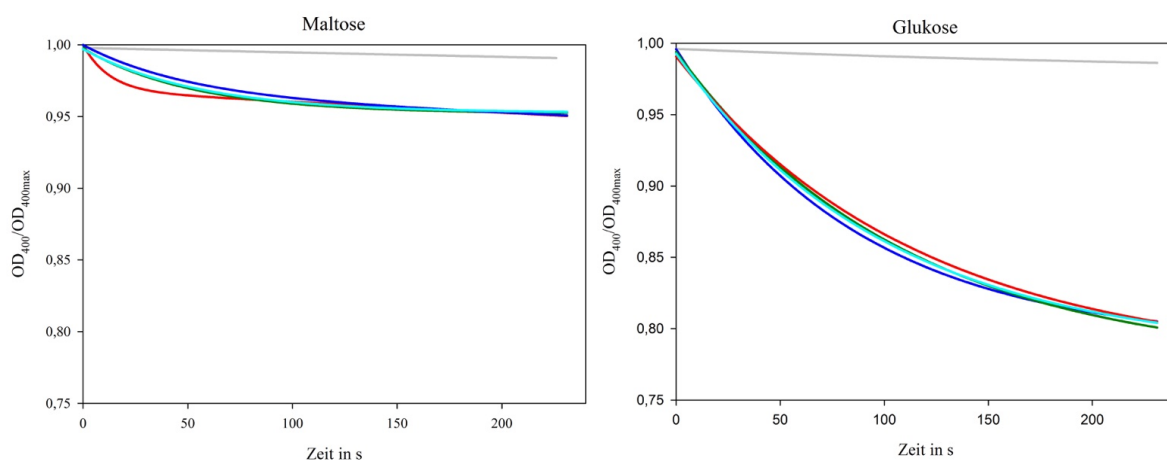


Abb. 3.15: Zuckertransport in PorB_{W135}-Mutanten. Die durch den Transport von Glukose bzw. Maltose induzierte Schwellung der PorB-Proteoliposomen, wird nach Verdünnung in eine 60 mM Zucker-Stammlösung (jeweiliger Zucker ist angegeben) in Abhängigkeit der Absorptionsintensität bei 400 nm dargestellt. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. Die Daten wurden nach exponentieller Annäherung angepasst. Wildtyp (—), G103K (—), G103M (—), G103D (—), Kontrolle mit PorB-freien Liposomen (—).

3.2.6 Kristallstrukturen von PorB_{W135}-G103K und -G103D

Als Grund der Inhibierung des Antibiotikatransportes in PorB_{gon} wurden neben sterischen Einflüssen auch mögliche Konformationsänderungen des L3 diskutiert, welche durch die Mutation an der PorB_{W135}-äquivalenten Position G103 ausgelöst wurden (Olesky *et al.*, 2002). Um mögliche Konformationsänderungen als Ergebnis der G103-Mutation in PorB_{W135} zu untersuchen bzw. den inhibierten Antibiotikatransport besser erklären zu können, wurden nachfolgend die Kristallstrukturen der Mutanten G103D wie auch G103K aufgelöst. Die in Abb. 3.16 gezeigten Strukturen wurden durch Methoden des *rigid body* sowie *restrained refinements* mit dem verbesserten Suchmodell von PorB_{W135} aus Abschnitt 3.2.1 (Raumgruppe P₆₃, Auflösung 1,78 Å) aufgelöst und durch mehrere Runden manueller Strukturbildung mit anschließender automatischer Strukturverfeinerung optimiert. Die Statistiken der Datensammlung und Parameter nach Verfeinerung sind im Anhang (A.4) dargestellt. Dabei konnten Beugungsreflexe für G103K von bis zu 2,76 Å und 2,50 Å für G103D erhalten werden.

Die FoFc-Differenzelektronendichtekarten der Bereiche um die Aminosäuren 100 bis 106 in der G103K-Struktur bzw. 102-106 in der G103D-Struktur sind nach *refinement* zusammen mit der PorB_{W135}-Wildtyp-Struktur dargestellt (Abb. 3.16A). Anhand der Differenzelektronendichtekarten konnten zum Teil fehlende Atome in der Zielstruktur von G103K in unmittelbarer Nähe der Positionen 103 und 104 (Sigmalevel +3σ) identifiziert werden. Die Zielstruktur G103D zeigte ebenfalls fehlende Atome in der Umgebung der Position 104, aber nur sehr schwache Signale in der Umgebung der Position 103. Obwohl diese Differenzelektronendichten ziemlich genau an der Position der G103-Mutation vorzufinden sind, sind ihre Intensitäten nicht signifikant genug, um dies als das Vorhandensein des Lysin- (in der G103K-Struktur) bzw. Aspartataustausches (in der G103D-Struktur) zu bestätigen. Die jeweils an der Position 104 vorhandenen Differenzelektronendichten könnten als Auswirkung eines sterischen Effektes durch das Vorhandensein der Lysin- bzw. Aspartatmutation an der Position 103 interpretiert werden, welche möglicherweise eine Konformationsänderung des Aspartates jeweils an der Position 104 induziert. Doch wie bereits erwähnt, sind auch diese Differenzelektronendichten nicht signifikant genug, um diese Hypothese zu bestätigen.

In Abbildung 3.16B sind die hypothetischen Strukturen von G103K und G103D zusammen mit den 2FoFc-Elektronendichtekarten nach Einsetzen einer Lysin- (in G103K) bzw. einer Aspartatseitenkette (in G103D), sowie die strukturell umorientierten Aspartate an der

Position 104 gezeigt. Dabei ist erkennbar, dass Lys103 in der G103K- und Asp103 in der G103D-Struktur nicht vollständig aufgelöst vorliegen. Auch an der Position 104 ist jeweils das Aspartat nach Umorientierung in die FoFc-Differenzelektronendichten aus Abb. 3.16A nicht vollständig aufgelöst. Dadurch ist eine genaue Aussage über die Konformation der Positionen 103 und 104 in den G103K- bzw. G103D-Strukturen nur unzureichend möglich. In diesem Zusammenhang sind auch Aussagen über mögliche elektrostatische Änderungen, welche durch die Mutationen am L3 innerhalb des Kanals induziert wurden, nicht möglich.

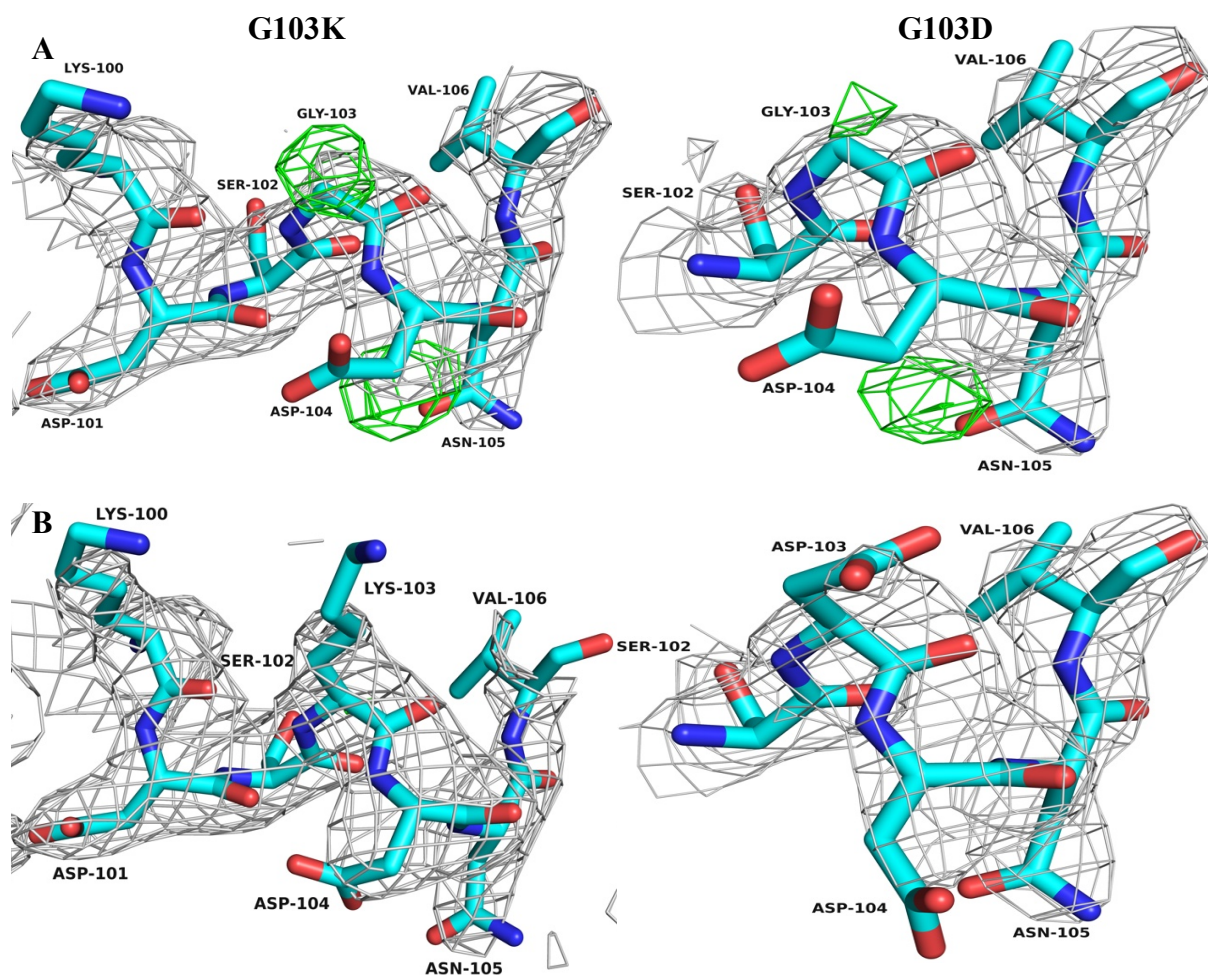


Abb. 3.16: Konformation von G103K und G103D. (A) Gezeigt ist der Bereich um die Position 103 in der Struktur von PorB in Stabdarstellung (C-Atome cyan, N-Atome blau, O-Atome rot). Zusätzlich ist die 2FoFc-Elektronendichtekarte (1σ , graues Gitter) und die FoFc-Differenzelektronendichtekarte ($+3\sigma$, grünes Gitter) von G103K und G103D nach *refinement* dargestellt. (B) Die hypothetischen Strukturen von G103K und G103D sind in Stabdarstellung (C-Atome cyan, N-Atome blau, O-Atome rot) zusammen mit den 2FoFc-Elektronendichtekarten (1σ , graues Gitter) nach finale *refinement* gezeigt.

3.2.7 Kristallstruktur von PorB_{W135} nach *soaking*-Experimenten mit Ampicillin

Soaking-Experimente von PorB_{W135} wurden mit unterschiedlichen Antibiotika, verschiedenen Zeitperioden und Konzentrationen durchgeführt, um mit komplexierten antibiotischen Molekülen einen genaueren Blick auf ihre Lokalisation und Bindung im Kanal zu erhalten. Dafür wurden PorB_{W135}-Kristalle in den gleichen Kristallisationspuffer überführt, welcher zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen an Antibiotikum enthielt. Datensätze von etwa 80 Kristallen mit Beugungsreflexen von mehr als 3 Å wurden aufgenommen und ihre Struktur mittels *rigid body* sowie *restrainend refinement*, mit der verbesserten PorB_{W135}-Struktur aus Abschnitt 3.2.1, aufgelöst (Raumgruppe P6₃, Auflösung 1,78 Å). Nach Auswertung konnten in den Datensätzen allerdings nur die bereits gezeigten Dichten der Cäsiumionen identifiziert werden (3.2.2), wobei eine dem Antibiotikum entsprechende Elektronendichte nicht zu finden war (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Teilblockierung des Antibiotikatransportes durch Mutation der Position 103, wurden die beiden PorB_{W135}-Mutanten G103K und G103D kristallisiert und ihre erhaltenen P6₃-Kristalle mit der entsprechenden Reservoirolösung, die zusätzlich 200 mM Ampicillin enthielt, für 5-20 min inkubiert. Etwa 40 Datensätze mit Beugungsreflexen höher als 3 Å wurden aufgenommen und ihre Strukturen wie zuvor durch *rigid body* und *restrained refinement* aufgelöst.

Nach Strukturaufklärung konnten zusätzliche Elektronendichten im PorB-Kanal nahe L3 identifiziert werden, welche sich in direkter Nachbarschaft zu den Positionen 103 und 104 befinden (Abb. 3.17). Des Weiteren wurden zwei anomale Datensätze bei einer Wellenlänge von 2,0 Å aufgenommen, welche der Absorptionskante eines Schwefelatoms (für den Nachweis des Schwefelatoms im Ampicillin-Molekül) entsprach. Die beiden anomalen Elektronen-dichtekarten (A.5) wurden anschließend gemittelt (FFT; Immirzi, 1966). Die Auswertung der anomalen Karten zeigte zwar ein Signal (Sigmalevel +5σ), welches sich in direkter Umgebung zu der neu identifizierten Dichte innerhalb des Kanals am L3 befand, allerdings konnten keine anomalen Signale für Schwefelatome in unmittelbarer Nähe vorhandener Methionine (Met55, Met334) mit einem Sigmalevel von > 3,0σ identifiziert werden. Aus diesem Grund könnte das identifizierte anomale Signal am L3 lediglich ein Artefakt sein und die Präsenz eines Schwefelatoms nicht genau bestätigt werden kann. Anschließend wurde die PorB_{W135}-Struktur zusammen mit einem Ampicillin-Molekül, welches in die FoFc-Differenzelektronendichte hineingelegt wurde, durch mehrere Runden manueller Strukturbildung mit anschließender automatischer Strukturverfeinerung optimiert.

Während dieses Vorganges wurde auch versucht, das Schwefelatom des Ampicillins in die anomale Elektronendichte zu platzieren. Aufgrund der niedrigen Auflösung von 3,16 Å konnte ein Ampicillin-Molekül letztendlich nicht vollständig in die Dichte gelegt werden, wobei auch die Orientierung dieses Moleküls nicht genau bestimmt werden konnte.

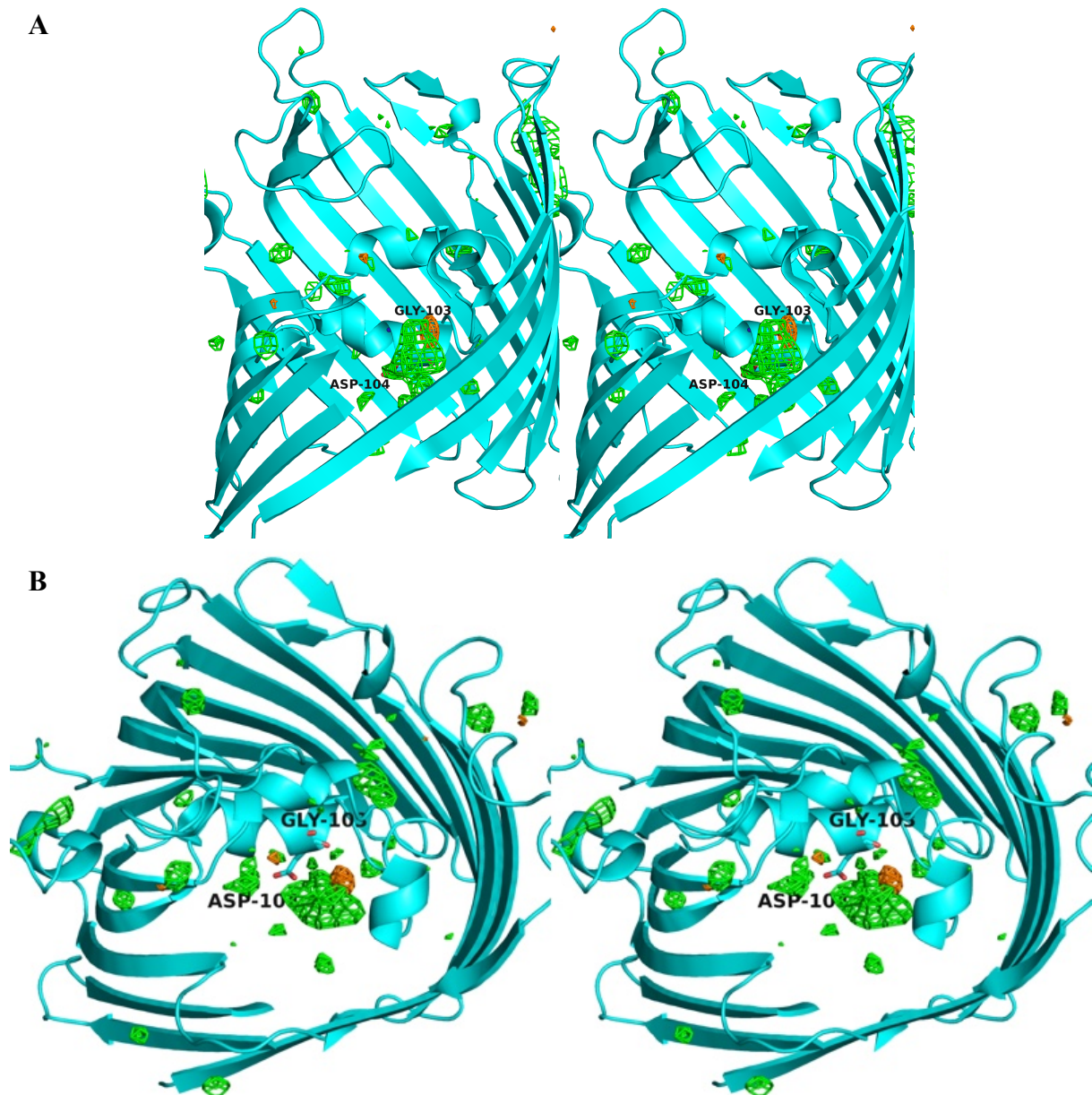


Abb. 3.17: Zusätzliche Elektronendichte nach *soaking* mit Ampicillin. Stereodarstellung von PorB_{W135} als *cartoon* in cyan mit der FoFc-Differenzelektronendichtekarte (+3,0σ, grünes Gitter) und der gemittelten anomalen Elektronendichtekarte (+5σ, oranges Gitter) der aufgelösten PorB_{W135}-G103D-Struktur (nach Ampicillin-*soaking*) von der (A) Membranseite und (B) extrazellulären Seite. Die Reste G103 und D104 sind in Stabdarstellung gezeigt (C-Atome cyan, O-Atome rot).

3.3 PorB_B aus *Neisseria meningitidis*

Wie bereits erwähnt, zeigten PorB-Sequenzvergleiche (Abb. 3.10) innerhalb der Gattung *Neisseria* stark konservierte Bereiche für die β -Faltblatt-Membrandomäne und ausgeprägte Variabilität innerhalb der extrazellulären *loop*-Domänen, welche mutmaßlich für die TLR-Bindung verantwortlich sind. Biochemische Interaktionsstudien von TLR2-exponierten HEK-Zellen mit unterschiedlichen PorB_B-Mutanten, welche Aminosäureaustausche in den extrazellulären *loops* aufwiesen, zeigten als Folge eine signifikant reduzierte Fähigkeit die TLR2-abhängige Immunantwort im Vergleich zum Wildtyp auszulösen (Abb. 1.10). Dafür wurden spezifische Reste aus PorB-*loop*-Regionen der kommensalen *N*_{lac} auf die entsprechenden Bereiche des PorB_B übertragen. Eine veränderte PorB_B-Variante im *loop 7* (PorB_{AKR}) zeigte dabei die stärkste Immunogenitätsabnahme, in welcher die Seitenketten D259, D260 und E266 gegen A259, K260 und R266 ausgetauscht wurden (Toussi *et al.*, 2012b). Um mögliche strukturelle Gründe für diese Varianz zu identifizieren, wurden sowohl der Wildtyp (PorB_B) als auch die AKR-Mutante (PorB_{AKR}) kristallisiert und ihre 3D-Strukturen aufgeklärt.

3.3.1 Proteinkristallisation

PorB_B-Kristalle wuchsen mit der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen innerhalb von vier Monaten in 50 mM Cäsiumchlorid, 0,1 M MES pH 6,5-7,0, 29-35% (v/v) Jeffamin M-600, während PorB_{AKR}-Kristalle in 65 mM HEPES pH 7,5, 1,1 M tri-Natriumzitat im Verlauf von zwei Wochen ihre maximale Größe erreichten (Abb. 3.18). Dabei zeigten PorB_B-Kristalle Beugungsreflexe von max. 3,3 Å und PorB_{AKR}-Kristalle bis zu 2,4 Å. Die Strukturen beider Moleküle wurden durch molekularen Ersatz mit dem Suchmodell (PorB_{gon}, 4AUI) gelöst und die Struktur danach verfeinert (A.7).

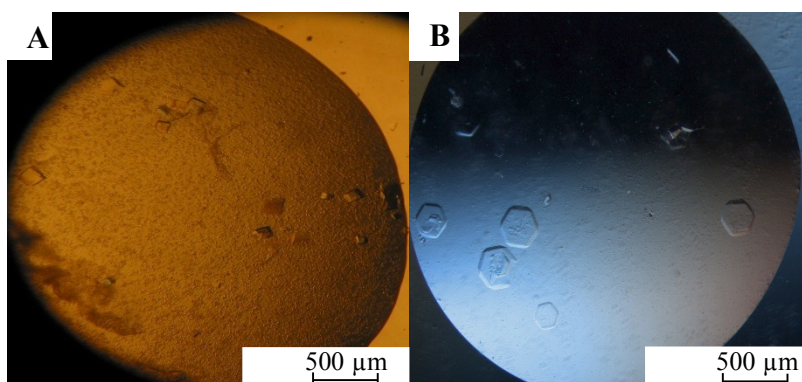


Abb. 3.18: Kristallbilder von PorB_B und PorB_{AKR}. Gezeigt sind die Kristalle von (A) PorB_{AKR} und (B) PorB_B in der Raumgruppe R32.

3.3.2 Struktur von PorB_B und PorB_{AKR}

Erste Strukturlösungsversuche mit PorB_{W135} (3VZT) als Suchmodell, konnten die extrazellulären *loop*-Regionen aufgrund einer wahrscheinlich zu geringen Sequenzidentität von 63% nur unzureichend mit R-Werten (R_{work} und R_{free}) von über 30% auflösen. Durch den Einsatz des Suchmodells PorB_{gon} (4AUI, Zeth *et al.*, 2013), welches eine Identität von 77% zu PorB der Serogruppe B aufweist, konnten die Strukturen gelöst werden (Statistiken im Anhang A.7).

Die Strukturen von PorB_B wie auch PorB_{AKR} unterschieden sich nur minimal von den bereits bekannten Strukturen von PorB_{W135} und PorB_{gon} (Abb. 3.19A). Die Moleküle haben eine Fassstruktur, bestehend aus 16 β -Faltblättern, sieben kurzen periplasmatischen *turns* und acht langen, extrazellulären *loops*. Die Kristallanordnung war für beide trimere Moleküle unterschiedlich (Abb. 3.19B, C). Während mögliche Kristallkontakte benachbarter PorB_B-Moleküle zwischen sich gegenüberliegenden periplasmatischen *turns* und den jeweils extrazellulären L1 und L1 bzw. L6 und L6 vorliegen, existieren PorB_{AKR}-Molekülkontakte nur zwischen den extrazellulären L1 und L6 von benachbarten Trimeren, nicht jedoch zwischen Bereichen der periplasmatischen Seite.

Der Strukturvergleich von PorB_B und PorB_{AKR} mit allen bisher gelösten PorB-Strukturen zeigte zwar keine wesentlichen strukturellen Unterschiede innerhalb der Transmembrandomänen und des für die Transporteigenschaften wichtigen L3, aber ausgeprägte Differenzen in den *loop*-Bereichen (Abb. 3.19A).

A



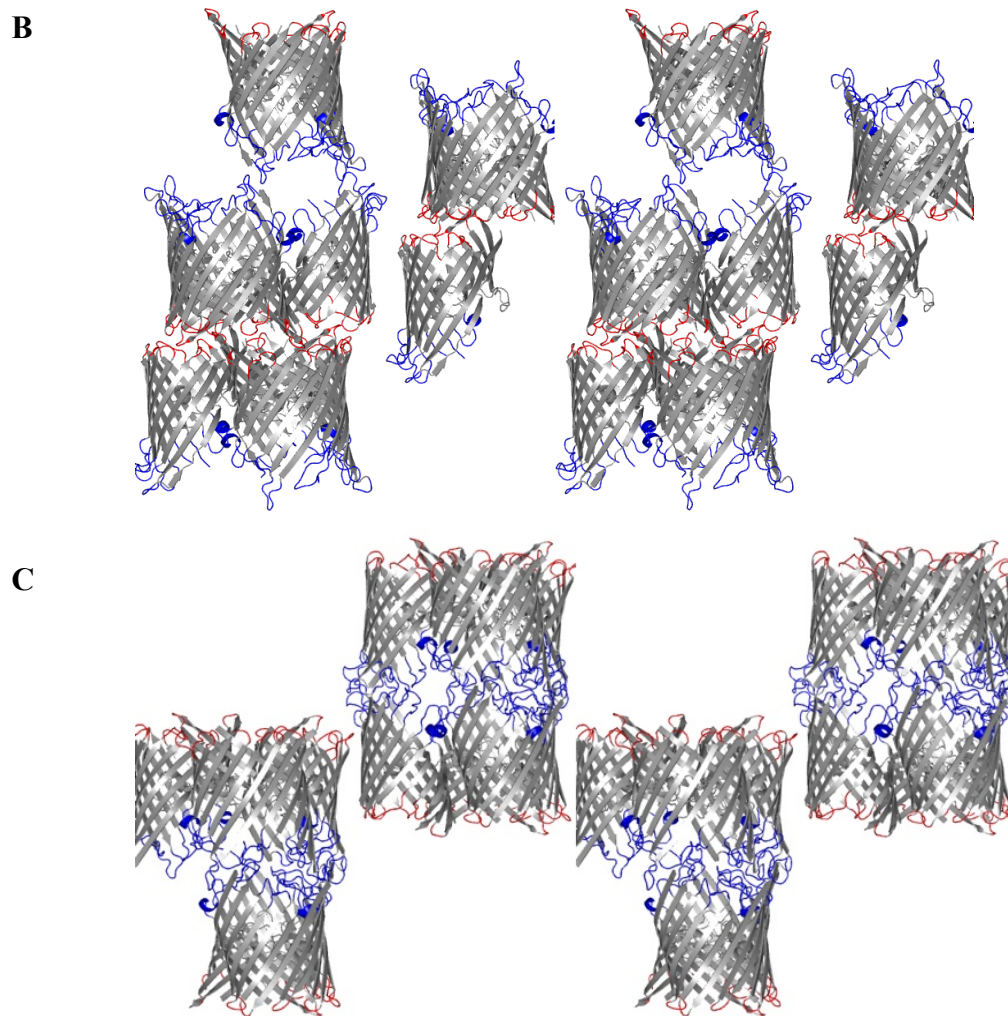


Abb. 3.19: Strukturvergleich bekannter PorB-Moleküle und Kristallanordnung von PorB_B und PorB_{AKR}. (A) Dargestellt ist die Struktur von PorB_{W135} (orange), PorB_{gon} (grün, 4AUI, Zeth *et al.*, 2013), PorB_B (cyan) und PorB_{AKR} (rosa) jeweils als *cartoon*-Darstellung von der Membranseite. Stereodarstellung der Molekülanordnung von (B) PorB_B und (C) PorB_{AKR} von der Membranseite, mit eingefärbten Transmembrandomänen in grau, *turns* in rot und *loop*-Regionen in blau.

3.3.3 PorB_{AKR} im Komplex mit Zitrat

Während des Prozesses der Strukturaufklärung von PorB_{AKR} konnten innerhalb des Kanals Elektronendichten zweier Zitrat-Moleküle identifiziert werden, welche wahrscheinlich aus dem Kristallisationspuffer stammten (Abb. 3.20A, D). Eine zusätzlich durchgeführte automatische Ligandensuche mit dem Programm *Phenix-ligand identification* (Adams *et al.*, 2010) mit allen potentiellen Substanzen aus der Proteinaufreinigung und der Kristallisation als Suchobjekte, bestätigte mit einer hoher Wahrscheinlichkeit die Präsenz zweier Zitrat-

Moleküle in diesen Elektronendichten. Dabei waren diese, in wässriger Lösung negativ geladene Moleküle, nur durch die positiv geladenen Aminosäuren K63, R76, K99, R125, K41 mit Distanzen von 3,1 bis 3,8 Å koordiniert (Abb. 3.20C). Dadurch lagen sie inmitten des zuvor für PorB_{W135} identifizierten Anionentransportweges. Die Darstellung des Oberflächenpotentials verdeutlicht die Lage beider Zitrat-Moleküle innerhalb eines vollkommen positiv geladenen Bereiches (Abb. 3.20B).

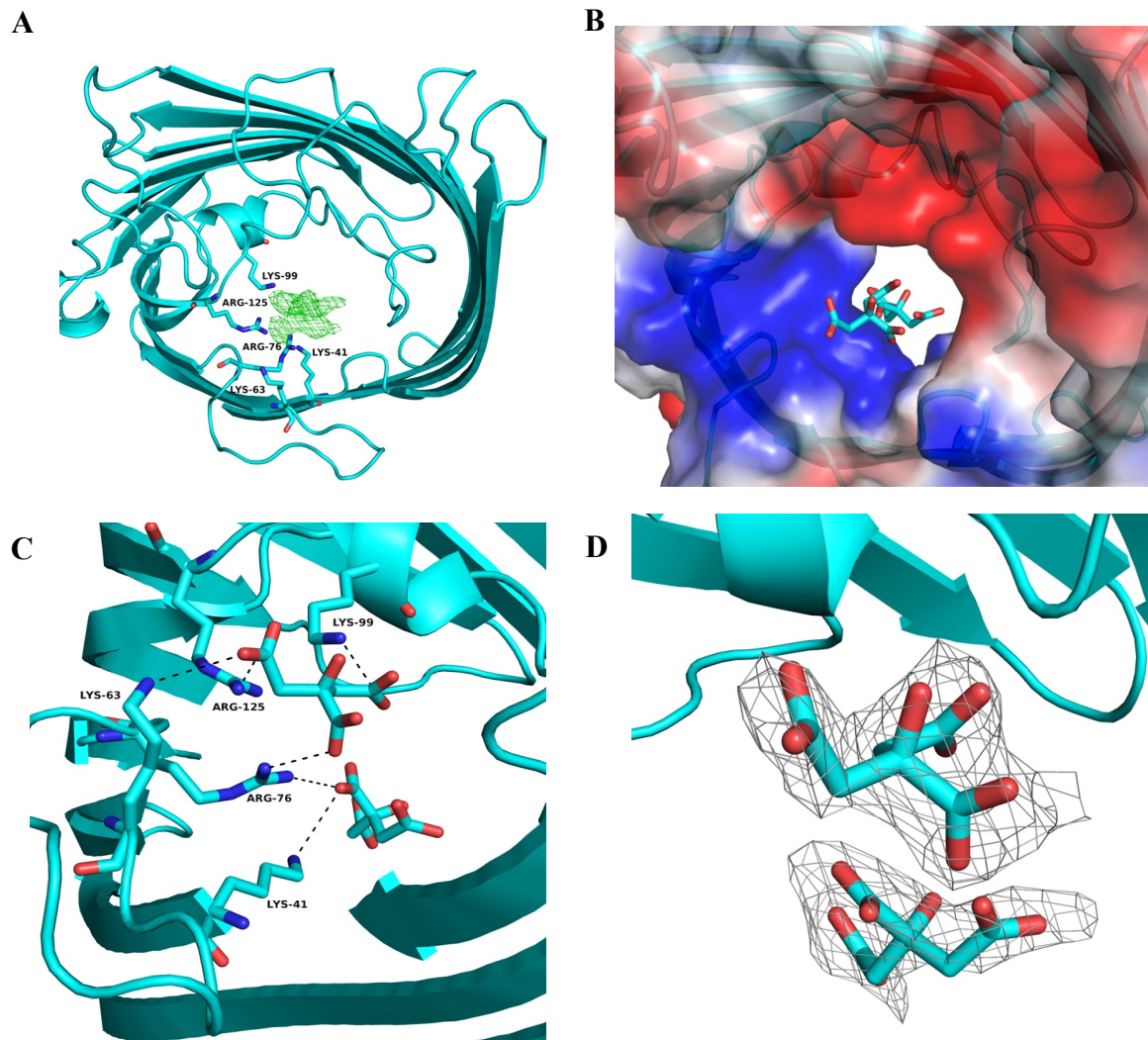


Abb. 3.20: PorB_{AKR}-Kristallstruktur im Komplex mit Zitrat. (A) PorB_{AKR} ist als *cartoon*-Darstellung in cyan, zusammen mit der neu identifizierten FoFc-Differenzelektronendichte (+3 σ , grünes Gitter) und dem positiv geladenen Arg/Lys-Cluster aus den Resten K63, R76, K99, R125, K41 (C-Atome cyan, N-Atome blau, O-Atome rot) in Stabdarstellung gezeigt. (B) Das Oberflächenpotential ist mit dem APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*, Baker *et al.*, 2001) berechnet und von der extrazellulären Seite mit den Positionen der Zitrat-Moleküle gezeigt. Bereiche mit positivem Potential sind blau, Bereiche mit negativem Potential rot dargestellt und von -20kT/e bis +20kT/e konturiert. (C) Alle Interaktionen mit Abständen von 3,1-3,8 Å sind durch gestrichelte Linien zwischen den jeweils in Stabdarstellung visualisierten Zitrat-Molekülen und dem positiv geladenen Arg/Lys-Cluster gezeigt. (D) Die beiden Zitrat-Moleküle (C-Atome cyan, O-Atome rot) sind zusammen mit der 2FoFc-Elektronendichte (+1 σ , graues Gitter) dargestellt.

3.3.4 Konformationen der extrazellulären *loops*, impliziert in der TLR-Bindung

Die Strukturlösung von PorB_B und PorB_{AKR} zeigte bis auf fehlende Dichte für die Aminosäuren 186-188 im L5 von PorB_B, gut aufgelöste Elektronendichten mit strukturierten und geordneten *loop*-Bereichen. Ein Strukturvergleich von beiden Molekülen konnte neben allgemein vorliegender Strukturidentität innerhalb der Transmembrandomänen und auch nahezu allen *loop*-Regionen, eine signifikante Konformationsänderung des L7 zeigen, in welchem die AKR-Mutation lag (Abb. 3.21D, E). Dabei wies L7 mit einem RMSD-Wert von 4,41 Å im Vergleich zum Mittelwert der verbleibenden sieben *loop*-Regionen (RMSD 0,81 Å) die höchste Varianz auf (Abb. 3.21F).

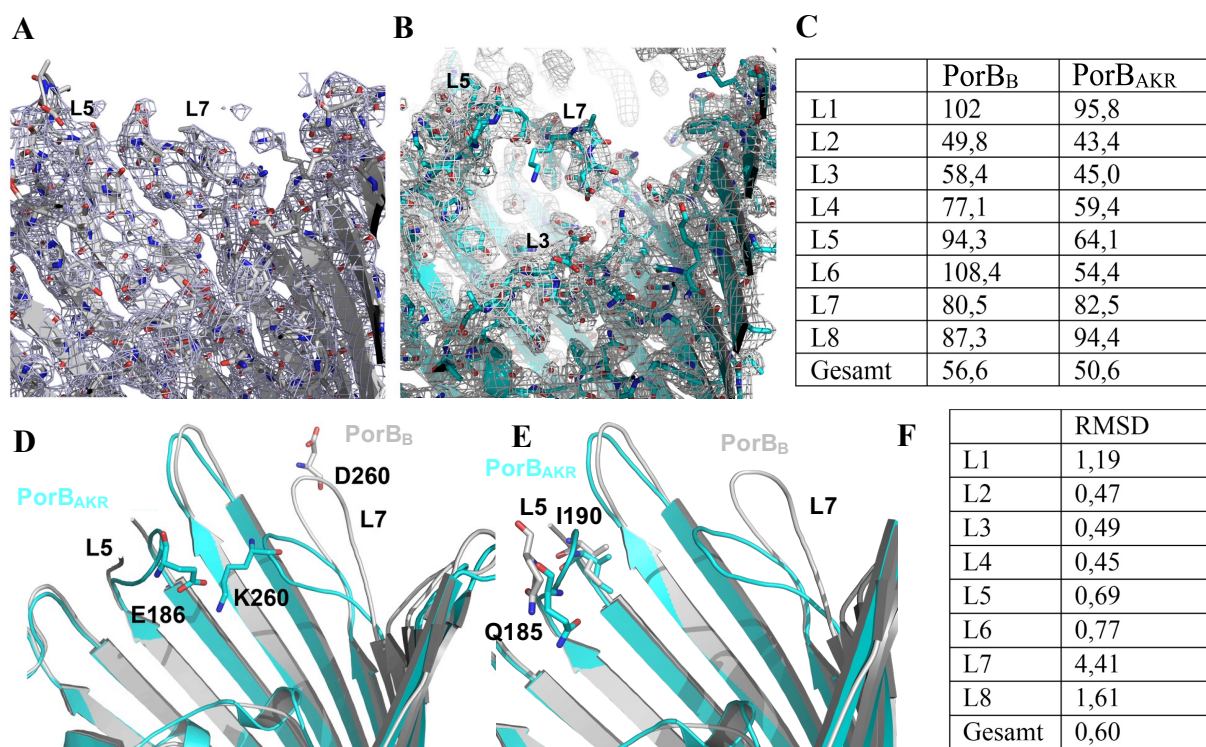


Abb. 3.21: Strukturdarstellung für PorB_B und PorB_{AKR}. Dargestellt sind die *cartoon*-Abbildungen von (A) PorB_B in grau und (B) PorB_{AKR} in cyan zusammen mit den 2FoFc-Elektronendichtekarten (+1 σ , graues Gitter) im Bereich von L5 und L7. (C) Die B-Faktoren wurden für die *loops* beider Strukturen berechnet. (D) Gezeigt ist die veränderte Position von D260 (PorB_B) bzw. K260 (PorB_{AKR}), zusammen mit der L7-Konformationsänderung und der daraus resultierenden Interaktion mit E186 in L5 von PorB_{AKR}. (E) Ebenfalls ist die veränderte Position von Q185 und I190 innerhalb von L5 in PorB_{AKR} dargestellt. (F) RMSD-Werte sind für die *loops* 1-8 berechnet worden.

Die ausgeprägte Konformationsänderung von L7 könnte einerseits durch die beschriebenen Mutationen induziert worden sein, andererseits können an dieser Stelle Einflüsse von Kristallkontakten zwischen L7 und L1 des benachbarten Trimers nicht ausgeschlossen werden, da sich diese beiden *loops* in direkter Nachbarschaft befinden. L1 weist in diesem Zusammenhang allerdings keine signifikante Konformationsänderung zu PorB_B auf.

Ein Vergleich der B-Faktoren zwischen PorB_B und PorB_{AKR} zeigte eine zum größten Teil ähnliche Flexibilität der extrazellulären *loops* (Abb. 3.21C) sowie aller periplasmatischen *turns*. Kombiniert mit dem nahezu identischen B-Faktor von L7 könnte dies ein Hinweis sein, dass die hier gezeigte Strukturänderung kein Resultat einer erhöhten *loop*-Flexibilität ist.

Um Hinweise für die Ursache der L7-Konformationsänderung zu erhalten, wurden Computersimulationen mit RosettaBackrub (Smith und Kortemme, 2008) durchgeführt, in welchen alle möglichen potentiellen L5- und L7-Konformationen, sowie ihre Wahrscheinlichkeiten berechnet wurden. Dabei zeigten sieben der zehn wahrscheinlichsten PorB_B-Konformationen eine senkrechte Ausrichtung von L7 zur Membran, wie sie ebenfalls in der kristallographisch ermittelten Struktur auftrat (Abb. 3.22A). Die Vorhersage für PorB_{AKR} wiederum zeigte in neun der zehn wahrscheinlichsten Konformationen eine Krümmung von L7 in Richtung des inneren PorB-Kanals (Abb. 3.22B). Tendenziell zeigten die simulierten Strukturen eine vergleichbare Konformation von L5 und L7 zur kristallographisch identifizierten Struktur.

Die Struktursimulation (Abb. 3.22C) der Mutanten PorB_{GEG} (Mutation in L5) und PorB_{L147P} (Mutation in L4), welche im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls schwächere Immunantworten induzierten (Abb. 1.10), sollten im Vergleich zur PorB_{AKR}-Mutation analysiert werden. Dabei änderte die Mutation an der Position 147 in L4 (L147P) die Struktur nicht signifikant, während die Einführung von drei zusätzlichen Aminosäuren (Gly, Glu, Gly) in PorB_{GEG} eine Umorientierung von L5 zum Kanallinneren induzierte, vergleichend zur Auswirkung der PorB_{AKR}-Mutation.

Zusätzlich erfolgten Moleküldynamikanalysen (durchgeführt von Ulrich Zachariae, University of Dundee) mit in POPC-Doppellipidschichten eingebetteten PorB_B- und PorB_{AKR}-Trimeren. Diese zeigten in 300 ns-Simulationen (1 bar, 300 K), dass die Richtungskrümmung von L7 eine Folge der Mutation ist. Es stellte sich heraus, dass die L7-Konformation in der Kristallstruktur vermutlich stabil war und nur geringe Fluktuationen aufwies (Abb. 3.22D, E), wobei L7 in PorB_B kontinuierlich senkrecht zur Membran faltete (Abb. 3.22D), während L7 in PorB_{AKR} in den inneren Kanalbereich orientiert war (Abb. 3.22E).

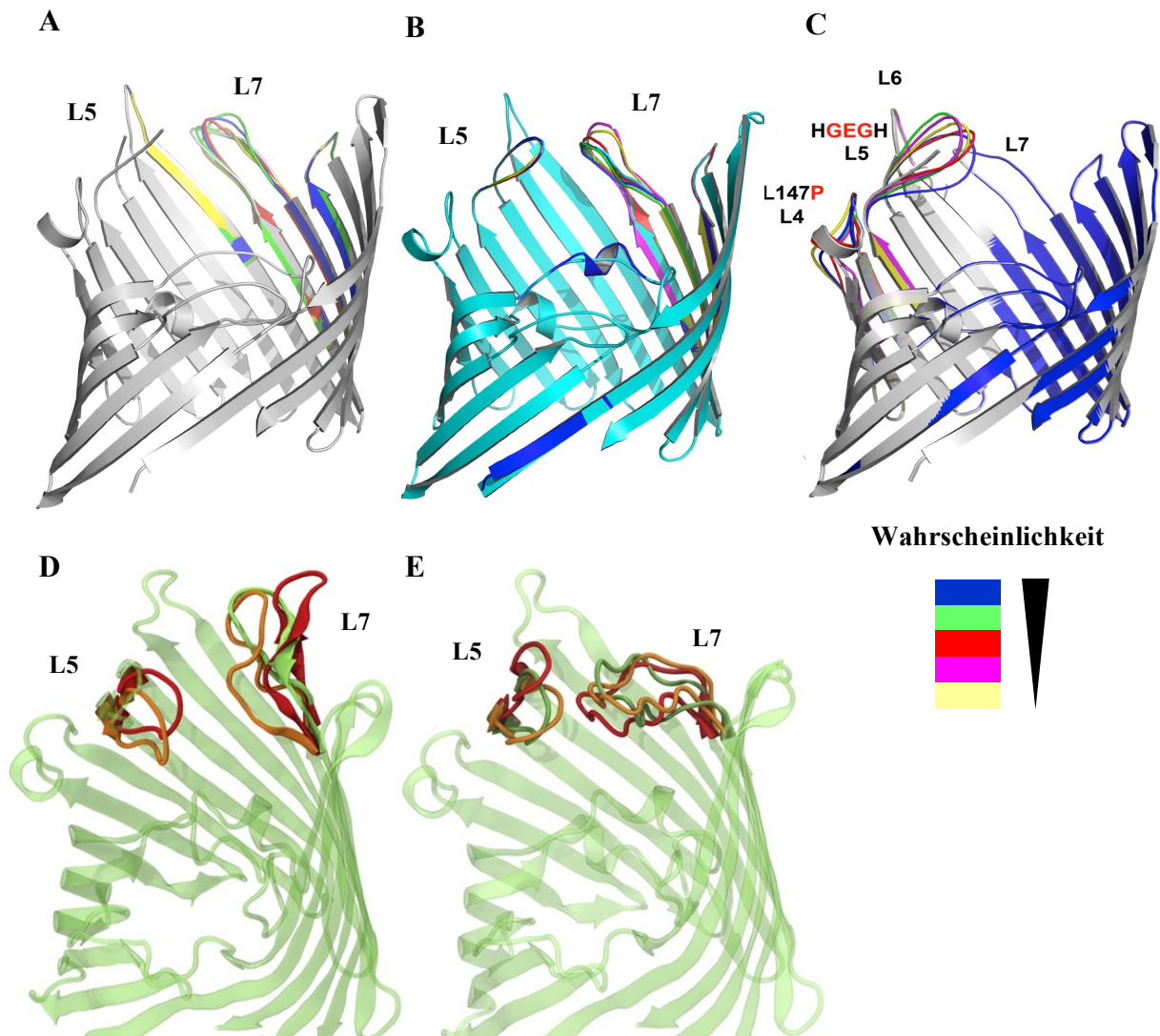


Abb. 3.22: Analyse der L7-Konformation durch Computer- und Moleküldynamik-Simulationen. Gezeigt ist als *cartoon*-Darstellung die Strukturvorhersage für (A) PorB_B in grau, (B) PorB_{AKR} in cyan und (C) der Mutanten PorB_{GEG} (Mutation in L5) und PorB_{L147P} (Mutation in L4) jeweils in grau, mit den fünf wahrscheinlichsten Strukturen (mit abnehmender Wahrscheinlichkeit: blau, grün, rot, magenta, gelb), angezeigt mit Farbcode. Durch MD-Simulationen von (D) PorB_B und (E) PorB_{AKR} konnte ebenfalls ein Konformationsunterschied zwischen L5 und L7 (gezeigt in orange und rot) simuliert werden, welcher der Anordnung im Kristall (grün) entspricht. Dabei ist die Konformation von L7 stabiler und würde in PorB_B kontinuierlich senkrecht zur Membran falten, während L7 in PorB_{AKR} in den inneren Kanalbereich orientiert ist.

Durch die Strukturaufklärung von PorB_{W135} konnte eine mögliche Interaktion von PorB mit TLR2 über elektrostatische Wechselwirkungen von exponierten, geladenen Resten vermutet werden (Tanabe *et al.*, 2010). Somit ist es denkbar, dass geladene Reste innerhalb von L7 ebenfalls eine wichtige Rolle in dieser Interaktion einnehmen könnten.

Die Analyse der Nettoladung in PorB_B (Abb. 3.23) zeigte eine allgemein negative Ladung von -2 (+32/-34), wobei diese Ladung durch die AKR-Mutation zu einer positiven Ladung von +3 (+34/-31) in PorB_{AKR} verändert wurde. Positive Nettogesamtladungen sind ebenfalls mit +10 (+44/-34) und +5 (+37/-32) in PorB_{W135} bzw. PorB_{gon} zu finden. Dabei ist die Ladungsverteilung in den exponierten *loops* (mit Ausnahme von L2 und L3, welche mit geringer Wahrscheinlichkeit exponiert sind) noch auffälliger mit -3 (+9/-12) in PorB_B, +2 (+11/-9) in PorB_{AKR} (induziert durch die AKR-Mutation) und +6 (+18/-12) in PorB_{W135}. Es zeigte sich eine Ladungsumkehr in L7 von -3 (+1/-4) in PorB_B zu +2 (+3/-1) in PorB_{AKR}. Dadurch könnte die aufrechte L7-Konformation in PorB_B einen stark negativ geladenen Bereich exponieren, während die Krümmung von L7 in den inneren Bereich von PorB_{AKR} an dieser Stelle einen neutralen Bereich hinterließ, der potentiell in der Region der TLR2-Bindung lag.

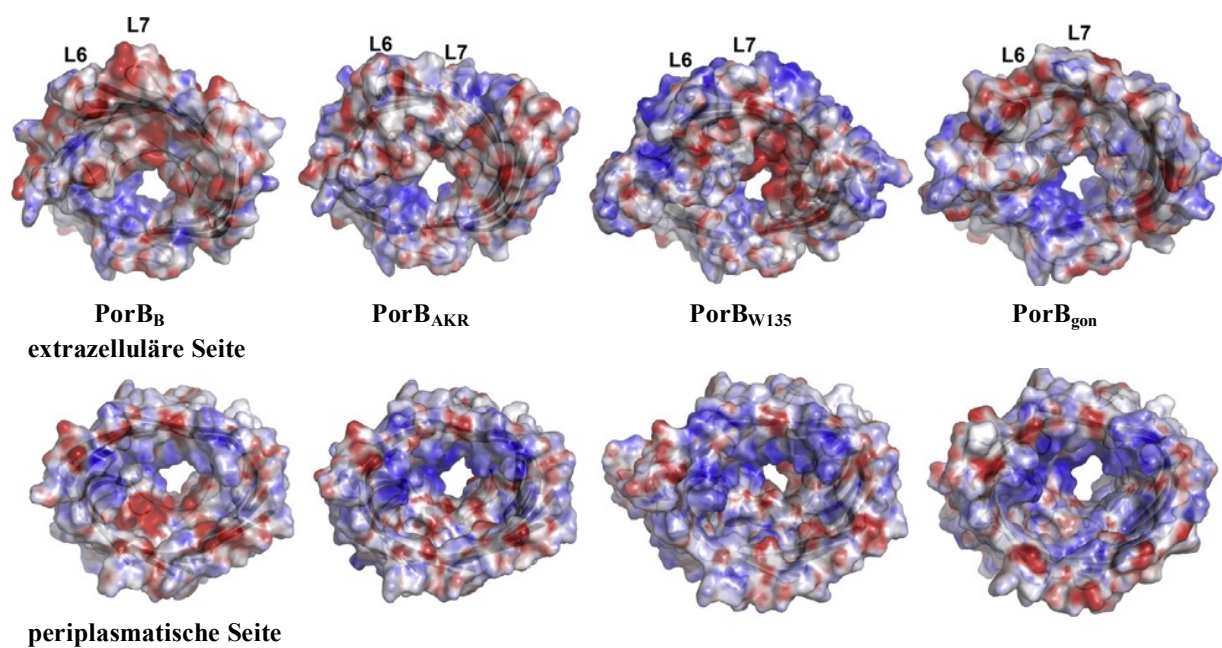


Abb. 3.23: Vergleich der elektrostatischen Oberflächen unterschiedlicher PorB-Moleküle. Die elektrostatische Oberfläche verschiedener PorB-Moleküle ist von der extrazellulären (oben) und periplasmatischen Seite (unten) gezeigt. Oberflächenpotentiale sind mit dem *Adaptive Poisson Boltzmann Solver* (APBS, Baker *et al.*, 2001) berechnet und von -20 bis +20 kT/e konturiert. Dabei sind positiv geladene Bereiche blau und negativ geladene Bereiche rot dargestellt.

3.3.5 Zuckertransport in PorB_B nach Rekonstitution in Proteoliposomen

Um die Translokation von Zuckermolekülen mit PorB_{W135} vergleichen zu können, erfolgte die Messung des Zuckertransportes durch Analyse der Liposomenschwellung in PorB_B-Proteoliposomen (Abb. 3.24). Dafür wurde die Liposomenlösung in 60 mM Zuckerlösungen verdünnt und der Transport durch Messung der optischen Dichte bei 400 nm aufgezeichnet (2.5). Die Identifizierung der isoosmotischen Konzentration erfolgte zuvor mit dem Tetrasaccharid Stachyose, welches ein Molekulargewicht von 667 Da hat.

PorB_B differenzierte stark im Transport von Mono- und Disacchariden, mit einem deutlich geringeren Transport von Disacchariden (Abb. 3.24). Das Monosaccharid Glukose wies den größten Transport auf, wobei die zwei weiteren Monosaccharide Galaktose und Rhamnose minimal schwächer durch den PorB_B-Kanal transportiert wurden. Zusätzlich konnte ein signifikant verringerter Transport der Disaccharide Maltose und Saccharose ermittelt werden, welcher noch 16% (Maltose) bzw. 13% (Saccharose) der Transporteffizienz von Glukose hatte. Mit einem Molekulargewicht von 505 Da zeigte der Dreifachzucker Raffinose einen etwas schwächeren Transport gegenüber den beiden Disacchariden auf, welcher im Vergleich zu Glukose etwa 8% betrug. Ein Transport des Vierfachzuckers Stachyose konnte nicht festgestellt werden.

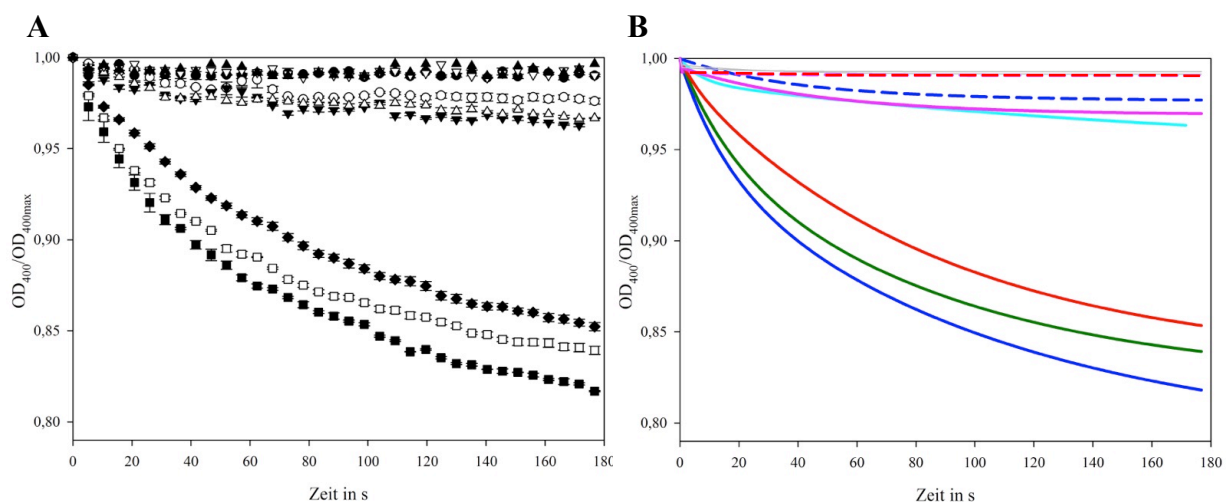


Abb. 3.24: Zuckertransport in PorB_B-Proteoliposomen. Die durch den Transport von Zucker induzierte Schwellung der PorB_B-Proteoliposomen, wird nach Verdünnung in eine 60 mM Zucker-Stammlösung (jeweiliger Zucker ist angegeben) in Abhängigkeit der Absorptionsintensität bei 400 nm dargestellt. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. **(A)** Rohdaten. **(B)** Angepasste Kurven nach exponentieller Annäherung. Stachyose (●/---), Raffinose (○/---), Maltose (▼/---), Saccharose (Δ/---), Glukose (■/---), Galaktose (□/---), Rhamnose (◆/---), Glukose in Porin-freien Liposomen (◇/---), Maltose in Porin-freien Liposomen (▲/---).

3.4 Interaktionsstudien zwischen PorB und dem humanen TLR 2

3.4.1 Auswahl des Expressionssystems zur Produktion des humanen TLR 2

Die Porine PorB aus *N. meningitidis* (Massari *et al.*, 2002) wie auch FomA aus *F. nucleatum* (Toussi *et al.*, 2012a) und OmpP2 aus *H. influenzae* (Galdiero *et al.*, 2004), konnten bereits als Liganden für den humanen Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) identifiziert werden. Dabei erfolgt die Ligandenbindung im Fall von PorB über ein Heterodimer aus den beiden Rezeptoren TLR1 und TLR2 (Massari *et al.*, 2006).

Eine nähere biochemische sowie strukturelle Charakterisierung des PorB-TLR2-Komplexes war ein wichtiger Ansatzpunkt dieser Arbeit, womit die Expression der an diesem Komplex beteiligten extrazellulären Domäne des TLR2 (sTLR2) eine zentrale Bedeutung einnahm.

Bei der Auswahl eines geeigneten Expressionssystems musste neben der Proteinfunktionalität auch die Gewinnung einer ausreichenden Proteinmenge, im Hinblick auf mögliche röntgenkristallographische Untersuchungen, in Betracht gezogen werden.

Aus der Literatur ist die Expression von TLRs mit anschließender Strukturaufklärung nur in eukaryontischen Expressionssystemen wie dem Bakulovirus-System für die TLR1, 2, 4, 6 (Jin *et al.*, 2007, Kang *et al.*, 2009) oder der Drosophila S2-Insektzelllinie für den TLR8 (Tanji *et al.*, 2013) bekannt. Durch diese Systeme konnten zwar native und funktionelle Proteine für die Strukturaufklärung erhalten werden, aber mit einer vergleichsweise niedrigen Proteinausbeute. Somit fiel die Wahl der Expression des sTLR2 auf Hefeexpressionssysteme mit *P. pastoris* und *S. cerevisiae*. Diese können die meisten posttranslationalen Modifikation im Vergleich zu höheren eukaryontischen Systemen ebenfalls durchführen, allerdings mit dem Nachteil eines unterschiedlichen Glykosylierungsmusters (Sodoyer, 2004).

Durch die C-terminale Fusion verschiedener extrazellulärer TLR-Domänen mit einem Bereich des variablen Lymphozytenrezeptors (VLRB.61) aus der Klasse der *Myxini* (Schleimaale), konnte sowohl die Stabilität als auch die Proteinausbeute unterschiedlicher TLRs bereits in Säugertierzellen erheblich gesteigert werden (Kim *et al.*, 2007, Jin *et al.*, 2007). Diese Fusion sollte ebenfalls in diese Arbeit einbezogen werden.

Die Generierung der Proteinfusion (sTLR2VLRB), bestehend aus dem C-terminalen VLRB.61-Überhang und dem extrazellulären Teil des TLR2 ohne Transmembrandomäne (sTLR2), erfolgte durch Gensynthese (eurofins, Hamburg), codon-optimiert für eine Proteinexpression im Hefesystem und ist im Anhang (A.8) beigefügt.

3.4.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung von sTLR2 in *P. pastoris*

Die Klonierung des Gens für die Expression des Fusionsproteins erfolgte für *P. pastoris* in den Vektor pPICZαB mit den im Anhang (A.1) gelisteten Primern. Das Konstrukt wurde nach Ligation durch Sequenzierung (Firma GATC, Koblenz) auf Vollständigkeit bzw. dem Vorhandensein möglicher Nukleotidmutationen analysiert. Die aus diesem Genkonstrukt übersetzte Aminosäuresequenz ist im Anhang (A.8) angegeben. Nach einer Testexpression wurde die Anwesenheit des Proteins durch Western-Blot analysiert und bestätigt (Abb. 3.25A). Zusätzlich zum sTLR2VLRB, mit einer theoretischen Größe von 63,3 kDa, wurden weitere Fragmente, welche wahrscheinlich einem N-terminalen Proteinabbau zugeordnet werden können, identifiziert. Da eine optimale Durchlüftung der Hefekultur unter diesen Bedingungen wahrscheinlich nicht gewährleistet werden konnte und der Grund für den starken Proteinabbau sein könnte, wurden weitere Expressionsoptimierungen mit Medienvolumina von 100 ml in 1000 ml-Schüttelkolben vorgenommen. In Abb. 3.25B kann die Detektion des sTLR2VLRB nach erfolgtem Zellaufschluss bestätigt werden, wobei durch optimierte Kulturbedingungen der Proteinabbau komplett unterdrückt werden konnte.

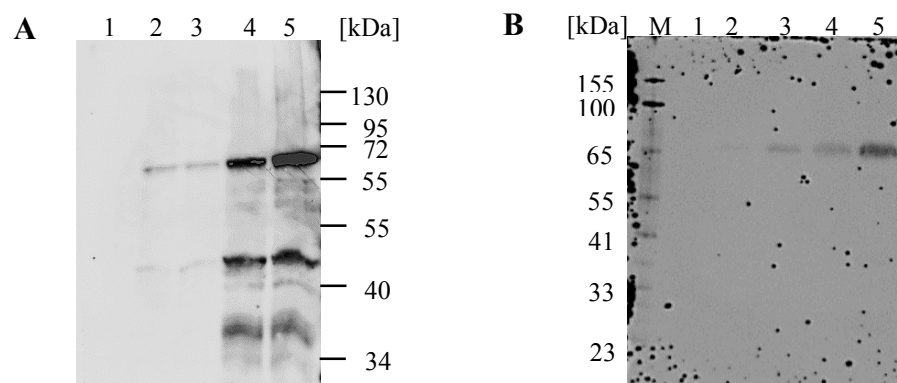


Abb. 3.25: Western-Blot-Analyse der Expression des sTLR2VLRB in *P. pastoris*. Antikörperspezifische (anti-His-Antikörper) Identifizierung des C-terminalen His-tags im Gesamt-Zellextrakt nach (A) Testexpression und (B) Optimierung der Expressionsbedingungen. M: Molekulargewichtsstandard. 1: 0 h nach Induktion. 2: 18 h nach Induktion. 3: 24 h nach Induktion. 4: 48 h Stunden nach Induktion. 5: 56 Stunden nach Induktion. Theoretisches Molekulargewicht von sTLR2VLRB: 63,3 kDa.

Aufgrund einer im Plasmid integrierten Sekretionssequenz wurde sowohl das Medium als auch der Überstand nach erfolgtem Zellaufschluss über eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt und der sTLR2VLRB im Eluat detektiert. Eine antikörperspezifische (anti-His-Antikörper) Identifizierung des C-terminalen His-tags konnte nach Reinigung nicht bestätigt werden, was auf eine mögliche Proteinaggregation oder einen Proteinabbau zurückzuführen werden könnte.

3.4.1.2 Klonierung, Expression und Reinigung von sTLR2 in *S. cerevisiae*

Wie bereits erwähnt, fand für die rekombinante Expression des sTLR2 neben *P. pastoris* auch das Hefesystem *S. cerevisiae* Verwendung. Die Einschleusung des sTLR2-kodierenden Gens in das Genom dieser Hefe erfolgte nach Protokoll (Drew *et al.*, 2008) durch homologe Rekombination (2.2.3.2) mit dem linearisierten Vektor pDDGFP2 und dem sTLR2-codierenden DNA-Produkt, die jeweils beide über homologe, flankierende Nukleotidsequenzen am 5'-Ende verfügten. Das Translationsprodukt wies dabei C-terminal eine GFP-Fusion auf. Diese Methode vereinte die Vorteile einer schnellen und spezifischen Identifizierung des heterologen Zielproteins durch die Fluoreszenzeigenschaft der GFP-Fusion und einer daraus eventuell resultierenden erhöhten Proteinstabilität, insbesondere im Fall von eukaryontischen Membranproteinen (Drew *et al.*, 2005, 2008). Die Detektion eines Fluoreszenzsignals ist in diesem Zusammenhang ein Hinweis auf eine korrekt ausgebildete Konformation des rekombinanten Proteins.

Auf diese Weise konnten zwei rekombinante *S. cerevisiae*-Stämme für die Expression von sTLR2_GFP und sTLR2VLRB_GFP erhalten werden (Tab. 3.3). Zusätzlich wurde ein drittes Konstrukt erstellt, welches C-terminal den bereits diskutierten GFP-tag beinhaltete und N-terminal von einem Maltose-Bindeprotein (MBP) flankiert wurde (MBP_sTLR2VLRB_GFP, theor. Masse 136,6 kDa). MBP fand in diesem Zusammenhang Verwendung, da es bereits als ein Faktor identifiziert werden konnte, welcher die Proteinlöslichkeit als auch -stabilität deutlich erhöhen konnte (Lian *et al.*, 2009, Pierre *et al.*, 2011, Kwon *et al.*, 2011).

Tab. 3.3: Rekombinante *S. cerevisiae*-Stämme zur Generierung des sTLR2. Die theoretischen Molekulargewichte sind durch ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) berechnet.

Bezeichnung	Molekulargewicht	Fusionen
sTLR2_GFP	83,4 kDa	C-terminales GFP
sTLR2VLRB_GFP	91,3 kDa	C-terminales GFP, VLRB.61-Fusion
MBP_sTLR2VLRB_GFP	136,6 kDa	N-terminales MBP, VLRB.61-Fusion, C-terminales GFP

Die Testexpression erfolgte im 5 ml-Maßstab in einem 50 ml-Reaktionsgefäß über einen Zeitraum von 24 Stunden, wobei die Gesamtzellextrakte nach erfolgtem Zellaufschluss durch eine SDS-PAGE getrennt und auf GFP-Fluoreszenz analysiert wurden (Abb. 3.26A). Im Vergleich zur GFP-Fluoreszenz der MBP_sTLR2VLRB_GFP-Fusion, zeigte sich lediglich eine schwache GFP-Fluoreszenz für die Proteine sTLR2_GFP und noch schwächer für sTLR2VLRB_GFP. Dabei stimmten die apparenten Molekulargewichte der drei Proteine (Abb. 3.26A) mit den theoretischen (Tab. 3.3) überein. Im Vergleich zu beiden sTLR2VLRB_GFP Konstrukten ohne N-terminales MBP, konnte die Expressionsrate des sTLR2 durch MBP-Fusion erheblich erhöht werden, wobei diese hohen Expressionsraten einen gewissen Proteinabbau zur Folge hatten. Generell scheint hier die C-terminale VLRB-Fusion keinen großen Einfluss auf eine Erhöhung der Expressionsrate zu haben. Die Kultivierungsoptimierung wurde im Rahmen einer Maßstabsübertragung durchgeführt, welche anschließend mit Medienvolumina von 10-1000 ml erfolgte und hauptsächlich eine optimale Durchlüftung der Kultur sicherstellen sollte (Abb. 3.26B). Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expressionsrate mit zunehmendem Expressionsvolumen nicht verschlechterte, sodass ein 1000 ml-Mediumvolumen als Standardexpressionsvolumen verwendet wurde, um eine maximal mögliche Biomasseausbeute zu erhalten.

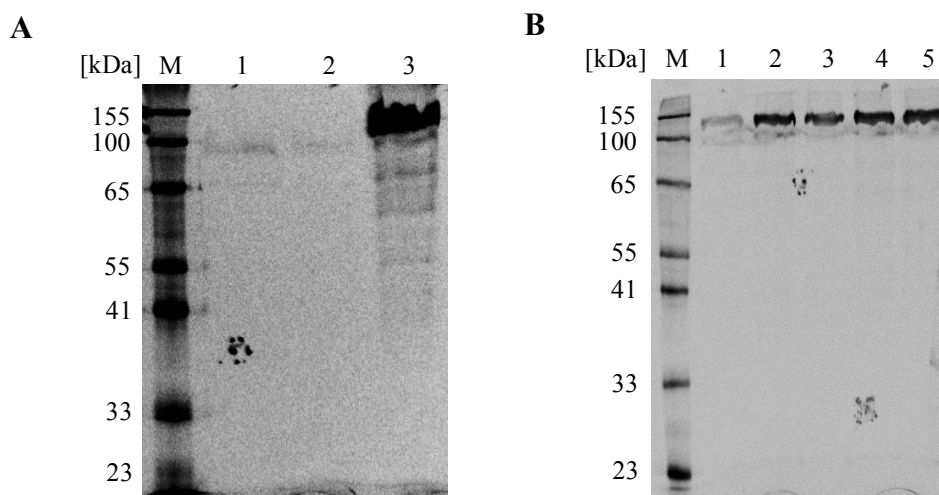


Abb. 3.26: SDS-PAGE-Analyse der sTLR2-Expression in *S. cerevisiae* durch GFP-Fluoreszenz. (A) Identifizierung von sTLR2 nach Zellaufschluss im Gesamtzellextrakt nach 24-stündiger Expressionsdauer. M: Molekulargewichtsstandard. 1: sTLR2_GFP. 2: sTLR2VLRB_GFP. 3: MBP_sTLR2VLRB_GFP. **(B)** Maßstabsübertragung der Expression von MBP_sTLR2VLRB_GFP. Mit einer identischen initialen optischen Dichte wurden unterschiedliche Kulturvolumina angeimpft und 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und mittels GFP-Fluoreszenz analysiert. M: Molekulargewichtsstandard. 1: 10 ml. 2: 100 ml. 3: 200 ml. 4: 500 ml. 5: 1000 ml.

Wie bereits in der Expression des sTLR2 in *P. pastoris* beobachtet wurde, konnte in *S. cerevisiae* das Protein nach Zellaufschluss sowohl in der Membranfraktion als auch in der löslichen Fraktion, trotz einer fehlenden Transmembrandomäne und Deletion des N-terminalen Signalpeptids, identifiziert werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der humane TLR2 möglicherweise neben der N-terminalen Signalsequenz über weitere Domänen verfügt, die das Protein an die Membran leiten, wobei der TLR2 möglicherweise nur schwach an die Membran bindet.

Somit erfolgten im Anschluss Aufreinigungsversuche des Proteins sowohl aus der löslichen als auch aus der Membranfraktion nach Zellaufschluss. Die Auswahl eines geeigneten Detergens zur Solubilisierung der Membranfraktion wurde durch Testsolubilisierung der aliquotierten Membranfraktionen in den Detergenzien DDM, OG, TDDG, Anzergent 3-14, C₁₂E₉, CHAPSO, α -DDM, LMNG, Cymal-6, NM, CHAPS, Fos14, LDAO und C₈E₄ durchgeführt. Dafür wurde die Membranfraktion in PBS-Puffer auf eine Konzentration von jeweils 3 mg/ml verdünnt, aliquotiert und mit 1% der verschiedenen Detergenzien auf 1,5 ml-Endvolumina vermischt. Die Suspension wurde eine Stunde bei 4°C mit Rühren inkubiert und anschließend zentrifugiert (100.000 x g, 60 min, 4°C), um die solubilisierbare Fraktion von unlöslichen Bestandteilen zu trennen. Als Vergleichskontrolle erfolgte eine Inkubation in Wasser bzw. Natriumdodecylsulfat (SDS). SDS solubilisiert Membranen zwar sehr effizient, allerdings begleitend mit einem negativen Einfluss auf die Proteinestabilität (Richter, 2003). Die GFP-Fluoreszenzdetektion diente zur Analyse der Solubilisierungseffizienz, indem der Überstand der einzelnen Fraktionen untereinander verglichen wurde (Abb. 3.27).

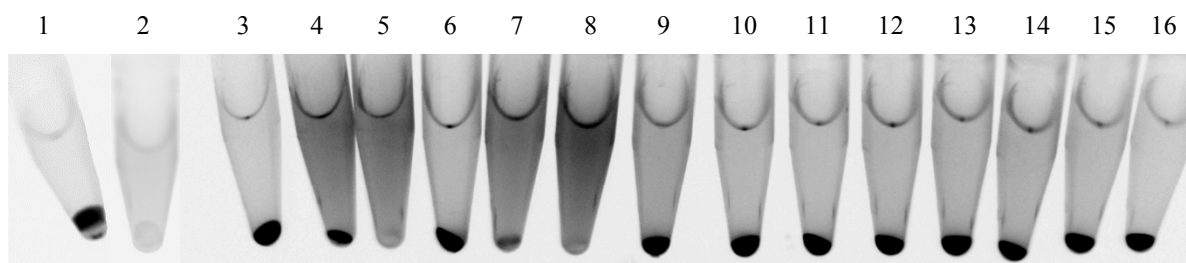


Abb. 3.27: Testsolubilisierung von MBP_sTLR2VLRB_GFP. Jeweils 3 mg/ml Membranfraktion (in 1x PBS-Puffer) wurde für 1 Stunde in 1% Detergens inkubiert und anschließend zentrifugiert (100.000 x g, 60 min, 4°C), um solubilisierbare Membranen von unlöslichen Bestandteilen bzw. nicht-solubilisierbaren Membranen zu trennen. Die Detektion erfolgte über GFP-Fluoreszenz. 1: Wasser. 2: SDS. 3: OG. 4: LDAO. 5: Fos14. 6: C₈E₄. 7: Anzergent 3-14. 8: TDDG. 9: DDM. 10: C₁₂E₉. 11: CHAPSO. 12: α -DDM. 13: LMNG. 14: Cymal-6. 15: NM. 16: CHAPS.

Die Analyse der Solubilisierungseffizienz der einzelnen Detergenzien zeigte für LDAO, Fos14, DDM, TDDG und Anzergent 3-14 (Abb. 3.27/4, 5, 7, 8, 9) die besten Solubilisierungsergebnisse aller getesteten Detergenzien, da diese Fraktionen die stärkste GFP-Fluoreszenz hatten. SDS-PAGE-Analysen der solubilisierten Überstände bestätigten die beste Solubilisierungseffizienz dieser fünf Detergenzien (Daten nicht gezeigt). Die Wasserkontrolle zeigte wie erwartet keine Solubilisierung, mit einer GFP-Fluoreszenz ausschließlich im Pellet (Abb. 3.27/1). Im Gegensatz dazu solubilierte SDS die Membranfraktion nahezu vollständig, jedoch ohne das Protein hinreichend zu stabilisieren, womit eine GFP-Fluoreszenz nicht nennenswert detektiert werden konnte (Abb. 3.27/2).

Mit diesen benannten Detergenzien wurden im Anschluss einzelne Ni-NTA-Reinigungen (Abb. 3.28) durchgeführt. Die verwendeten Detergenzkonzentrationen entsprachen einem 3x CMC und betragen für DDM 0,027%, LDAO 0,069%, Fos14 0,0138%, TDDG 0,003% und Anzergent 3-14 0,021%. Die Ni-NTA-Reinigung zeigte für die Fos14-, LDAO-, Anzergent 3-14- und TDDG-Fraktion eine weitestgehend vergleichbare Bindung und Elution des MBP_sTLR2VLRB_GFP, mit einer Bindungseffizienz von etwa 50% (Abb. 3.28). Zusätzlich zeigten alle Fraktionen einen Proteinabbau.

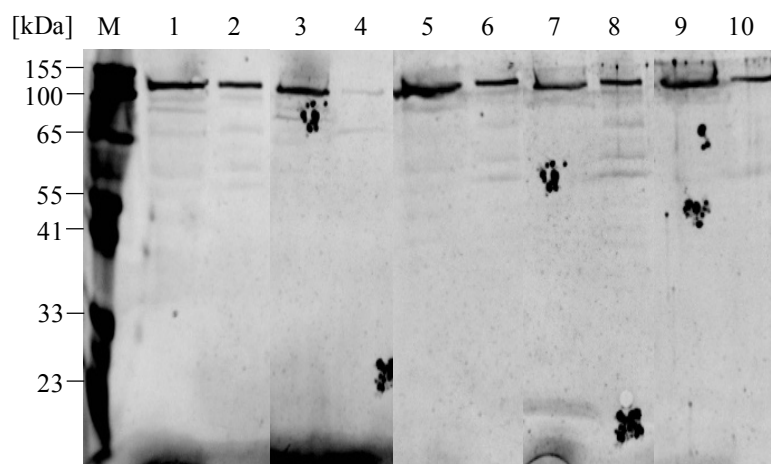


Abb. 3.28: SDS-PAGE-Analyse der Ni-NTA-Reinigung von MBP_sTLR2VLRB_GFP und anschließender GFP-Fluoreszenzdetektion. Nach Solubilisierung erfolgte die Reinigung des MBP_sTLR2VLRB_GFP durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie, mit welcher die Bindungseffizienz der jeweiligen Detergenzien analysiert werden sollte. Dafür wurden die jeweiligen Durchfluss- und Elutionsfraktionen über eine SDS-PAGE mit anschließender GFP-Fluoreszenzdetektion analysiert. Die Puffer enthielten eine 3x CMC der jeweiligen Detergenzien. M: Molekulargewichtsstandard. 1: Fos14 Durchfluss. 2: Fos14 Elution. 3: DDM Durchfluss. 4: DDM Elution. 5: Anzergent 3-14 Durchfluss. 5: Anzergent 3-14 Elution. 7: TDDG Durchfluss. 8: TDDG Elution. 9: LDAO Durchfluss. 10: LDAO Elution.

Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant schlechtere Bindung des in DDM solubilisierten Proteins an die Säule identifiziert werden (Abb. 3.28/4). Die Erklärung dafür könnte vielleicht die typischerweise große DDM-Mizelle sein, die das Protein stabilisierte aber den His-tag möglicherweise zu stark abdeckte und somit die Zugänglichkeit des tags reduzierte. Da alle Elutionsfraktionen im Vergleich zu den Durchflussfraktionen im SDS-Gel ein größeres Molekulargewicht aufwiesen (Abb. 3.28), könnte die möglicherweise vorhandene variable Faltung den His-tag unzugänglich machen und so die allgemein geringe Bindungseffizienz erklären.

Im Anschluss an die Ni-NTA-Reinigung folgten FSEC (*fluorescence size exclusion chromatography*)-Analysen, um das Detergens zu identifizieren, welches das sTLR2 am besten stabilisierte. Dabei ist die Peaksymmetrie des Fluoreszenz-Signals ein wichtiges Kriterium, um die Proteinhomogenität und -stabilität zu beurteilen (Abb. 3.29).

Die FSEC-Chromatogramme zeigten symmetrische Peaks für die Detergensfraktionen LDAO, Fos14, Anzergent 3-14 und DDM, wobei die LDAO-Fraktion die größte Fluoreszenzintensität und eine kleine Peakschulter aufwies. Im Gegensatz dazu zeigte TDDG einen breiten, unsymmetrischen Peak mit zwei Maxima, was eventuell ein Hinweis auf das Vorhandensein von zwei unterschiedlich stabilisierten Spezies sein könnte.

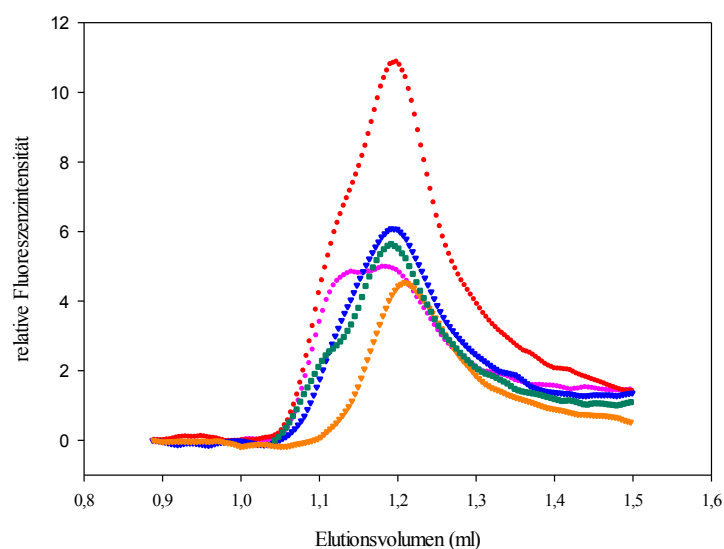


Abb. 3.29: FSEC-Chromatogramme mit gereinigtem MBP_sTLR2VLRB_GFP. Detektiert wurde das Fluoreszenzsignal des GFP nach Auftragen der solubilisierten und gereinigten Fraktion auf eine Superdex 200 5/150 GL Gelfiltrationssäule, welche mit einem Fluss von 0,2 ml/min über ein Volumen von 2 ml bei 4°C betrieben wurde. Alle Läufe erfolgten in 1x PBS pH 7,5, 150 mM NaCl, 3x CMC des jeweiligen Detergens. LDAO (●), TDDG (●), Fos14 (▼), DDM (▼), Anzergent 3-14 (■).

Eine weitere Beurteilung der Proteinstabilität erfolgte durch Inkubation der Eluate der Detergens-Fractionen LDAO, Fos14, DDM, Anzergent 3-14 und TDDG für fünf Tage bei 4°C. Um zu analysieren, welche dieser Detergens-Fractionen das Protein über diesen Zeitraum am besten stabilisiert und in Lösung hält, wurden die einzelnen Proben nach der fünftägigen Inkubationszeit geteilt und jeweils eine Hälfte davon zur Entfernung vorliegender Aggregate durch einen 0,22 µm-Filter filtriert. Beide Proben wurden anschließend mit einer SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.30).

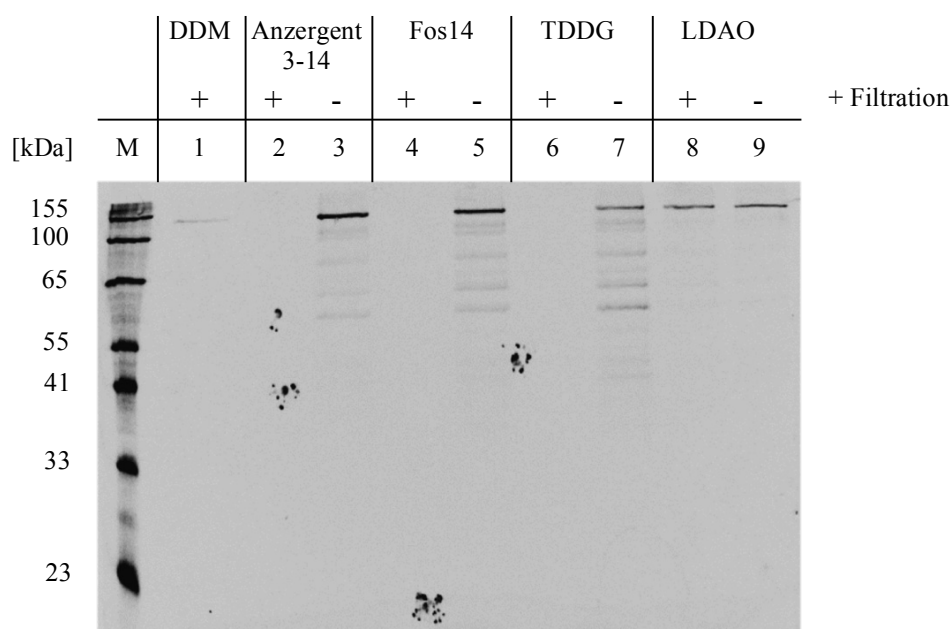


Abb. 3.30: SDS-PAGE-Analyse des Stabilitätstests von MBP_sTLR2VLRB_GFP durch GFP-Fluoreszenzdetektion. Die Elutionsfraktionen des in den Detergenzien LDAO, Fos14, DDM, Anzergent 3-14 und TDDG solubilisierten und gereinigten MBP_sTLR2VLRB_GFP wurden für fünf Tage bei 4°C inkubiert. M: Molekulargewichtsstandard.

Die Abbildung 3.30 zeigt, dass sich ein lösliches Protein nach der fünftägigen Inkubation von MBP_sTLR2VLRB_GFP nur in der LDAO-Fraktion (Abb. 3.30/8) und schwächer auch in der DDM-Fraktion befand (Abb. 3.30/1). In allen anderen getesteten Detergenzien war das Protein nach dieser Zeitdauer wahrscheinlich nicht mehr stabil, aggregierte möglicherweise und wurde durch die Filtration aus der Lösung entfernt, sodass es in der SDS-PAGE nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Dabei scheint auch ein Proteinabbau stattgefunden zu haben, welcher stark in den Fraktionen Anzergent 3-14, Fos14 und TDDG präsent war.

Zusammenfassend konnte die Stabilität des MBP_sTLR2VLRB_GFP im Detergens LDAO am besten nachgewiesen werden, welcher zusätzlich eine gute Bindung an die Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule erlaubte und in weiteren Experimenten Verwendung

find. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 3.31) zeigt die finale Reinigung des MBP_sTLR2VLRB_GFP-Fusionsproteins aus der löslichen Fraktion und der Membranfraktion, wobei zusätzlich zur Ni-NTA die spezifische Bindung des MBP an eine Amylosematrix als ein weiterer Reinigungsschritt ausgenutzt wurde (2.3.4.2). Die Analyse der Proteinreinigung erfolgte durch eine SDS-PAGE mit anschließender GFP-Fluoreszenz bzw. Silberfärbung.

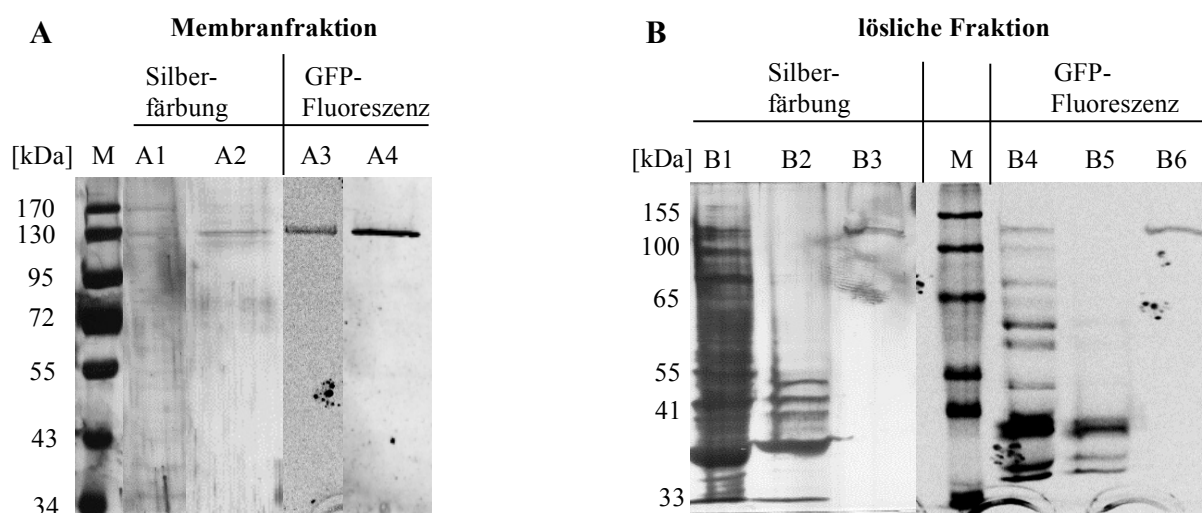


Abb. 3.31: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von MBP_sTLR2VLRB_GFP. Die Abbildungen zeigen den Reinigungsverlauf von MBP_sTLR2VLRB_GFP, welcher nach Zellaufschluss aus der (A) präparierten Membranfraktion und (B) der löslichen Fraktion gereinigt wurde. Die Banden A1 und A3 zeigen den Reinigungserfolg nach Ni-NTA, die Banden A2 und A4 nach Reinigung über die MBPTrap. Die Banden B1 und B4 zeigen den Reinigungserfolg nach Ni-NTA und die Banden B3 und B6 nach Reinigung über die MBPTrap. Die Banden B2 und B5 zeigen die Durchflussfraktion der Ni-NTA-Reinigung. M: Molekulargewichtsstandard.

Die Abbildung 3.31 zeigt die finale Reinigung des MBP_sTLR2VLRB_GFP nach Zellaufschluss aus der Membranfraktion (Abb. 3.31A) und der löslichen Fraktion (Abb. 3.31B). Dabei konnte das Protein durch zwei nacheinander folgende Affinitätsreinigungen (Ni-NTA und Amylose-Gelmatrix) homogen mit einer hohen Reinheit gereinigt werden (Abb. 3.31A/4 bzw. B/3). Die Entfernung der beiden Fusionen am N- und C-terminalen Ende des MBP_sTLR2VLRB_GFP erfolgte über spezifische Erkennungssequenzen durch nachfolgende Inkubationen des MBP_sTLR2VLRB_GFP mit den Proteasen TEV (Spaltung des GFP) bzw. Enterokinase (Spaltung des MBP). Der Verlauf der Spaltung des MBP-Fusionsproteins wurde bei 4°C bzw. Raumtemperatur in einem Zeitraum von 1,5 h-18 h nach Inkubation von jeweils 100 µg des Fusionsproteins mit 0,64 ng der Protease verfolgt. Die Analyse erfolgte durch GFP-Fluoreszenz über eine SDS-PAGE (Abb. 3.32), wobei der unverdaute MBP_sTLR2VLRB_GFP (Abb. 3.32/1) als Referenz

diente. Dabei sollte ein Protein (sTLR2VLRB_GFP) mit einem theoretischen Molekulargewicht von 91,3 kDa resultieren.

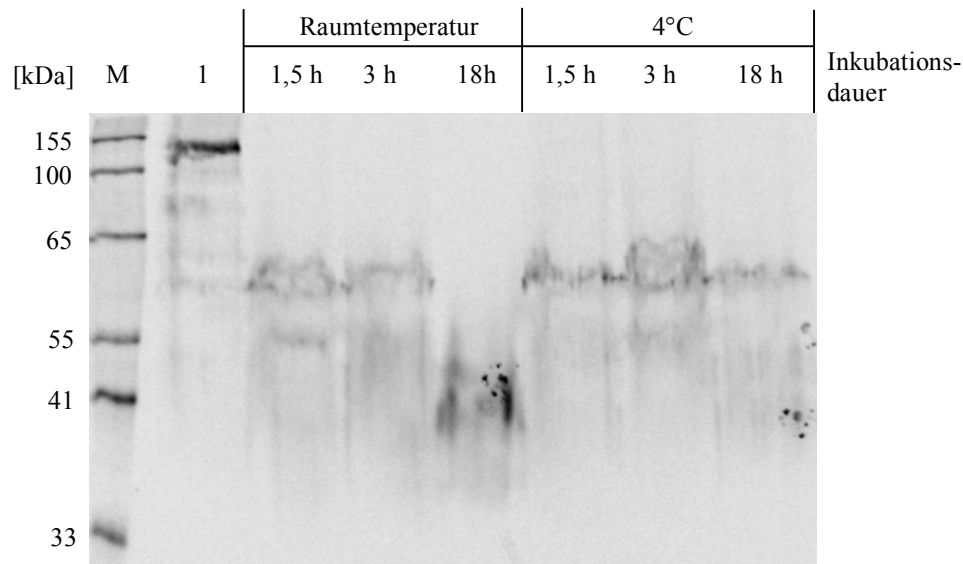


Abb. 3.32: SDS-PAGE-Analyse des Enterokinaseverdaus von MBP_sTLR2VLRB_GFP durch GFP-Fluoreszenz. Darstellung der Abspaltung der N-terminalen GFP-Fusion mittels Enterokinase bei Raumtemperatur bzw. 4°C. Dabei sollte ein Protein (sTLR2VLRB_GFP) mit einem theoretischen Molekulargewicht von 91,3 kDa resultieren. Als Referenz ist MBP_sTLR2VLRB_GFP angegeben (Reihe 1), welche nicht mit Enterokinase inkubiert wurde. M: Molekulargewichtsstandard.

Die Analyse der Spaltung des N-terminalen MBP-Fusionsproteins (Abb. 3.32) zeigte hauptsächlich Proteinfragmente, dessen Banden auf eine Größe von etwa 60 kDa schließen lassen konnten und somit nicht mit der zu erwartenden Proteingröße (91,3 kDa) korrelierten. Der Molekulargewichtsunterschied von etwa 30 kDa könnte das Ergebnis eines nicht gewünschten Proteinabbaus sein, welcher möglicherweise am N-terminus stattfand, da in allen Proben GFP-Fluoreszenz weiterhin detektiert werden konnte.

Die Entfernung der C-terminalen GFP-Fusion erfolgte durch Inkubation des Proteins mit der spezifischen TEV-Protease (2.3.4.2), wobei ein Produkt mit einem theoretischen Molekulargewicht von 107,5 kDa erwartet wurde. Die Analyse des Western-Blots (Abb. 3.33) konnte dabei ein Fragment mit der erwarteten Proteingröße (107,5 kDa) nicht detektieren. Es sind lediglich Proteinfragmente erkennbar, deren Proteinbanden auf Größen von etwa 43 kDa (entspricht dem freien MBP) und 75 kDa schließen lassen konnten. Aufgrund der erfolgten Detektion des freien MBP-Proteins (Abb. 3.33/2) konnte von einer MBP-Abspaltung ausgegangen werden. Somit scheinen die beiden Fusionsproteine essentiell für die Stabilität des Proteins zu sein.

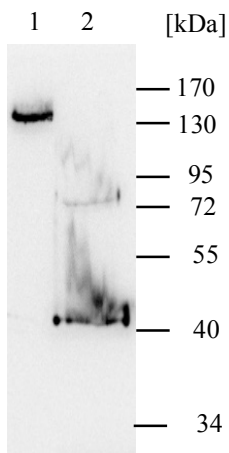


Abb. 3.33: Western-Blot-Analyse des TEV-Verdaus von MBP_sTLR2VLRB_GFP. 1: Referenz MBP_sTLR2VLRB_GFP (136,6 kDa) vor Spaltung. 2: nach TEV-Spaltung. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen anti-MBP-Antikörper.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die lösliche Domäne des TLR2 (sTLR2) als Fusionsprotein (MBP_sTLR2VLRB_GFP) in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert und anschließend auch mit einer angemessenen Reinheit und einer Ausbeute von etwa 0,26 mg Protein pro Liter Medium gereinigt werden konnte. Da die Abspaltung der beiden Fusionen die Proteinstabilität negativ beeinflusste, erfolgten alle weiteren Experimente mit dem MBP_sTLR2VLRB_GFP Fusionsprotein.

3.4.2 Interaktion zwischen PorB_B und dem humanen TLR 2

PorB_{men} ist ein auf Zellebene bereits gut beschriebener Ligand für den Toll-*like* Rezeptor 2, dessen Bindung die TLR1/2-abhängige humane Immunantwort spezifisch auslöst (Massari *et al.*, 2002; 2006; Liu *et al.*, 2010). Die genauen strukturellen Bindungscharakteristiken dieser Interaktion sind allerdings bis heute weitestgehend ungeklärt. Aus unveröffentlichten Bindungsstudien (persönliche Mitteilung Paola Massari, Boston School of Medicine) ging hervor, dass PorB_B im Vergleich zu PorB_{W135} eine stärkere Immunantwort induziert. Aus diesem Grund erfolgten die hier gezeigten Interaktionsstudien mit PorB_B.

Die Bindungsexperimente wurden dabei neben dem bereits beschriebenen MBP_sTLR2VLRB_GFP-Fusionsprotein auch mit einem an einen C-terminalen Fc-tag fusionierten löslichen Teil des TLR2-Rezeptors (sTLR2Fc) durchgeführt (2.3.4.3). Dieses in humanen HEK293-Zellen exprimierte Fusionsprotein, wies ein theoretisches Gesamtgewicht von 92,8 kDa auf und diente in den Bindungsstudien als Vergleich zum im Hefeexpressionssystem heterolog exprimierten MBP_sTLR2VLRB_GFP. Die Interaktion von MBP_sTLR2VLRB_GFP mit PorB_B wurde in initialen Studien mit einem *pull-down*-Assay untersucht (Abb. 3.34), wobei aufgrund der größeren Proteinstabilität der aus der löslichen

Fraktion gereinigte Rezeptor Verwendung fand. Das Prinzip der Durchführung ist dabei eine primäre Inkubation des Porins mit dem Rezeptor, dem nachfolgenden Auftragen dieser Lösung auf eine Ni^{2+} -Affinitätschromatographiesäule, dem Säulenwaschen zur Entfernung unspezifischer und nicht gebundener Moleküle und der finalen Elution. Aufgrund des fehlenden His-tags im PorB_B-Molekül, kann das Porin nur simultan im Komplex mit dem Rezeptor von der Säule eluieren, wobei die Präsenz beider Partner in der Elutionsfraktion ein Hinweis für einen existierenden Komplex sein kann. Um mögliche falschpositive Resultate auszuschließen, erfolgte in Vorversuchen die analoge Versuchsdurchführung mit der PorB_B-Fraktion ohne Ligand, um eine mögliche Bindung des Porins trotz fehlendem tag an die Säule zu untersuchen. Dabei konnte eine unspezifische PorB_B-Bindung ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Alle Versuche erfolgten mit einer vorhergehenden einstündigen Inkubation von PorB_B und sTLR2 (bzw. PorB allein für Kontrollversuch) bei 4°C. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 400 μM PorB_B und 80 μM MBP_sTLR2VLRB_GFP (fünffacher molarer Überschuss).

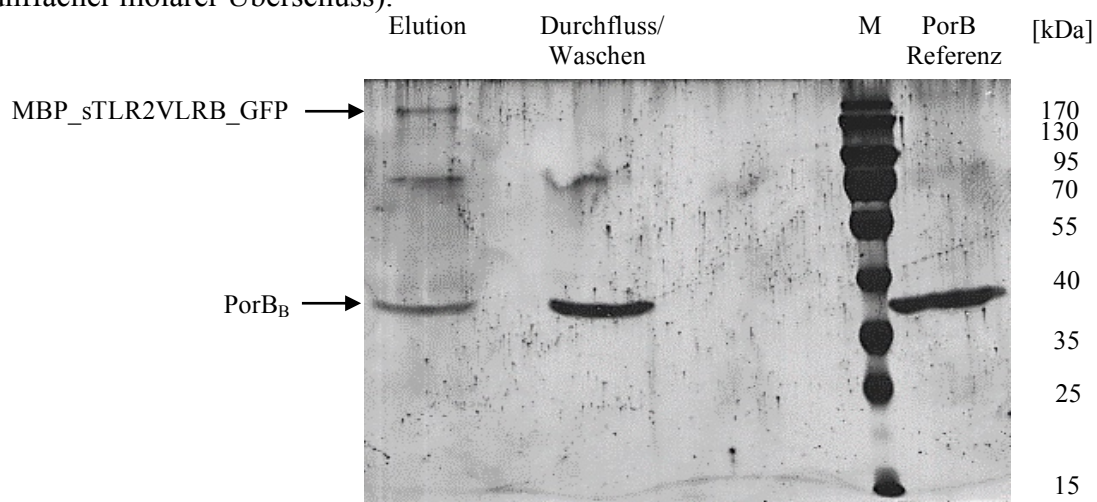


Abb. 3.34: *pull-down*-Assay mit PorB_B und MBP_sTLR2VLRB_GFP. Analysiert durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung. M: Molekulargewichtsstandard.

Die Auswertung der SDS-PAGE (Abb. 3.34) zeigte eine Co-Elution von PorB_B und MBP_sTLR2VLRB_GFP in der Elutionsfraktion. Das darin enthaltene ~80 kDa-Fragment scheint möglicherweise eine Verunreinigung aus der PorB_B-Reinigung zu sein, da die Bande ebenfalls in der PorB-Referenz schwach zu sehen war. Sowohl die ~130 kDa-Bande, welche dem MBP_sTLR2VLRB_GFP entsprach, als auch die ~37 kDa-Bande des PorB_B fanden sich in der SDS-PAGE in ihrem jeweiligen monomeren Zustand wieder. Des Weiteren ist ersichtlich, dass sich der Komplex aus PorB_B und dem TLR2 in der Eluatfraktion befindet, während das überschüssige, freie PorB_B im Durchfluss ist.

Zusätzlich war erkennbar, dass sich der Großteil der PorB_B-Fraktion im Durchfluss wiederfand und nur der sich im TLR2/PorB_B-Komplex befindliche PorB_B-Anteil anschließend in der Elutionsfraktion identifiziert werden konnte. Die Bindung des Rezeptors an die Säulenmatrix erfolgte vollständig über seinen C-terminalen His-tag, da kein ~130 kDa-Fragment im Durchfluss zu finden war. Das Vorhandensein beider Interaktionspartner in der Elutionsfraktion könnte als Hinweis einer Interaktion zwischen PorB_B und MBP_sTLR2VLRB_GFP gesehen werden, wobei die Stöchiometrie der Komplexbindung nicht analysiert werden konnte. Um auszuschließen, dass der hier möglicherweise identifizierte Komplex nicht auf einer zwischenzeitlichen Bindung von PorB_B mit den im Fusionsprotein enthaltenen flankierenden Regionen (MBP bzw. GFP) resultierte, erfolgten im Anschluss weitere *pull-down*-Assays mit His-tag enthaltenden MBP- und GFP-Proteinen, sowie SEC-Analysen nach vorheriger Inkubation beider Proteine mit PorB_B. Dabei konnte eine Interaktion von PorB_B weder mit GFP noch mit MBP identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Um die hier erzielten Ergebnisse der Interaktion verifizieren und vergleichen zu können, wurde der gleiche Ablauf des *pull-down*-Assays mit dem sTLR2Fc wiederholt (Abb. 3.35). Dabei erfolgte die Bindung aufgrund des im sTLR2Fc vorhandenen Fc-tag an eine Protein A-Affinitätschromatographiesäule (2.4.3). Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen wie zuvor 400 µM (PorB_B) bzw. 80 µM (sTLR2Fc). Auch hier wurden wieder Kontrollen durchgeführt, um unspezifische Interaktionen von PorB_B mit der Säule ausschließen zu können.

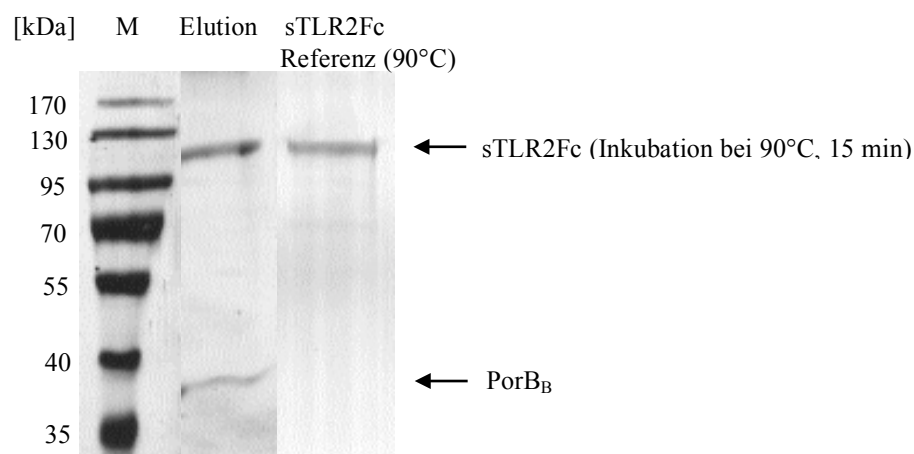


Abb. 3.35: SDS-PAGE-Analyse des *pull-down*-Assays mit PorB_B und sTLR2Fc nach Silberfärbung. Gezeigt ist die Elutionsfraktion des *pull-down*-Assays in welchem PorB_B und sTLR2Fc gemeinsam von der Säule eluieren (Elution). Die sTLR2Fc-Referenz ist zusätzlich mit Inkubation bei 90°C für 15 Minuten gezeigt. M: Molekulargewichtsstandard.

Die Auswertung des Assays (Abb. 3.35) zeigte eine gemeinsame Präsenz des PorB_B und sTLR2Fc in der Elutionsfraktion. Des Weiteren handelte es sich beim sTLR2Fc um ein höchstwahrscheinlich stark glykosyliertes Protein, was sich im Massenunterschied zwischen theoretischer Größe (92,8 kDa) und apparentem Molekulargewicht im Gel zeigte (Abb. 3.35). Ein höherer Oligomerisierungszustand könnte in diesem Zusammenhang vermutlich ausgeschlossen werden, da die Bedingungen während der SDS-PAGE-Analyse eine Dimerisierung wahrscheinlich verhinderten. Der sTLR2Fc zeigte zusätzlich ein apparentes Molekulargewicht von etwa 105 kDa, was von seinem theoretischen Molekulargewicht (92,8 kDa) abwich.

Die Interaktion zwischen PorB_B und sTLR2Fc wurde zusätzlich durch eine Größenausschlusschromatographie analysiert (Abb. 3.36A). Dafür wurde der Komplex aus PorB_B und sTLR2Fc nach einstündiger Inkubation bei 4°C im SEC-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05% LDAO) auf eine Superdex S200-Säule geladen. Als Referenz wurden unter den gleichen Bedingungen die Chromatogramme der beiden einzelnen Interaktionspartner aufgenommen.

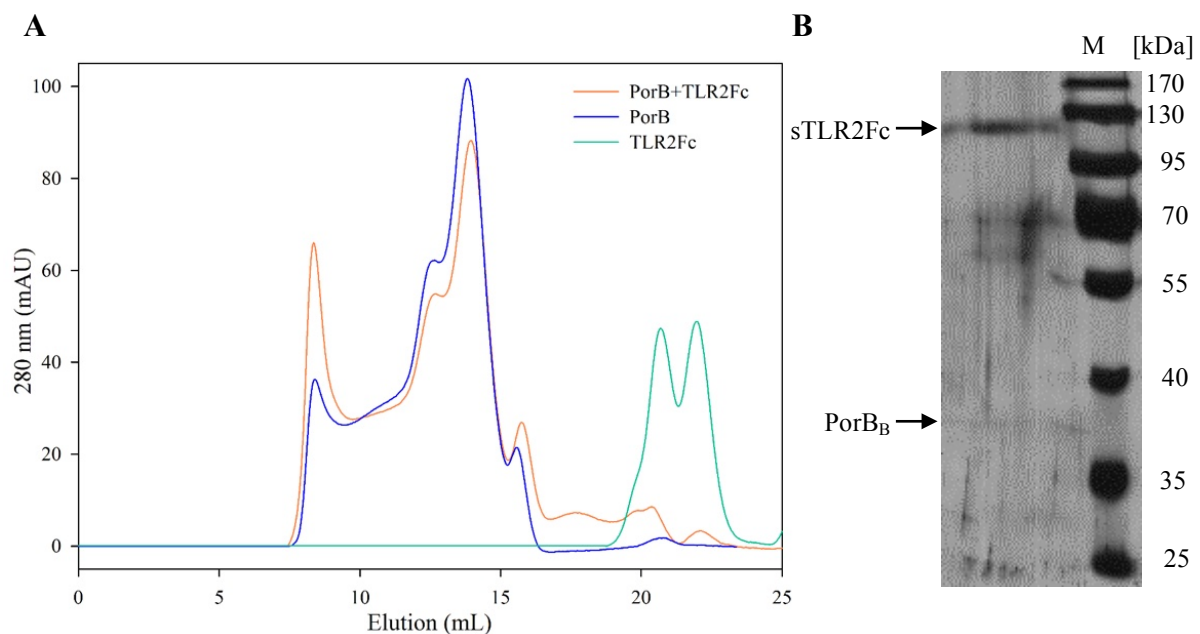


Abb. 3.36: SEC-Chromatogramm und SDS-PAGE zur Analyse der PorB_B-sTLR2Fc-Interaktion. (A) Die Proben (Komplex rot, PorB_B blau, sTLR2Fc grün) wurden auf eine Superdex S200 10/300 GL (24 ml Säulenvolumen, 0,4 ml/min) aufgetragen. Die Proteinkonzentration betrug 400 μ M (PorB_B) bzw. 80 μ M (sTLR2Fc). Die Läufe erfolgten im SEC-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05% LDAO). (B) Der Peak der 8,4 ml-Fraktion wurde aufgesammelt und mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert. Dabei konnte PorB_B und sTLR2Fc in dieser Fraktion identifiziert werden.

Das Chromatogramm des einzelnen sTLR2Fc-Laufes (Abb. 3.36A, grün) zeigte zwei Peak-Maxima bei 20,6 ml und 22 ml, die des PorB_B-Laufes (Abb. 3.36A, blau) bei 8,4 ml und 13,8 ml Elutionsvolumen. Das Chromatogramm des Komplexes (Abb. 3.36A, orange) wies einen vergleichbaren Verlauf zum PorB_B auf, wobei das Maximum bei 8,4 ml deutlich höher und bei 12,5 ml geringer ausfiel. Dabei konnten in diesem Profil keine freien sTLR2Fc-Moleküle detektiert werden. Zusätzlich wurde die 8,4 ml-Fraktion durch SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung analysiert, in welcher die Präsenz von PorB_B und sTLR2Fc bestätigt werden konnte (Abb. 3.36B). Die Fragmente mit einer Größe von etwa 70 kDa könnten Verunreinigungen oder Abbauprodukte darstellen.

Die genaue Stöchiometrie des PorB-TLR2-Komplexes ist nicht genau bekannt, wobei ähnlich durchgeführte Untersuchungen mit der löslichen Domäne von TLR2 (sTLR2) und dem PorB_{W135} einen 6:2 Komplex (zwei PorB_{W135}-Trimere binden an ein sTLR2-Dimer) vermuten ließen (Tanabe *et al.*, 2010). Ein 6:2-Komplex würde in diesem Zusammenhang ein Molekulargewicht von etwa 486 kDa bedeuten. In diese Rechnung wurde das Molekulargewicht von zwei PorB_B-Trimeren und einer LDAO-Mizelle (~150 kDa) (Tanabe *et al.*, 2010) und einem sTLR2Fc-Dimer von 186 kDa mit einbezogen, wobei unklar ist, ob die extrazelluläre Domäne des TLR2 ebenfalls mit einer LDAO-Mizelle interagiert. In diesem Fall würde das Molekulargewicht aufgrund von mindestens einer LDAO-Mizelle (etwa 25 kDa, Strop und Brunger, 2005) auf 511 kDa ansteigen. Somit ist es durchaus möglich, dass das erhöhte Peak-Maximum des Komplexes bei 8,4 ml (Abb. 3.36A, orange) auf eine Interaktion bzw. Komplexbildung beider Proteine und dem damit auftretenden, großen Molekulargewichtskomplex zurückzuführen ist.

Anschließend durchgeführte ITC-Analysen (A.10) mit PorB_B und sTLR2Fc bzw. MBP_sTLR2VLRB_GFP sollten die Bindungsparameter und Stöchiometrie dieser Interaktion analysieren. Trotz der Variation der Bedingungen, wie z.B. Pufferzusammensetzung und Proteinkonzentration, konnten keine Hinweise einer Bindung erhalten werden.

Die Bindung von PorB_B mit sTLR2Fc wurde auch durch Kryo-Elektronenmikroskopie (*negative staining*) analysiert. Dafür wurden die beiden Interaktionspartner zunächst für eine Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend durch eine Protein A-Affinitätschromatographie (2.4.3) gereinigt. Die Präparation der Probe sowie die Aufnahme der Mikroskopiebilder erfolgten durch Dr. Annette Meister (Universität Halle-Wittenberg), wobei Hinweise einer Komplexbildung nicht erhalten werden konnten.

3.5 OmpP2 aus *Haemophilus influenzae*

3.5.1 Proteinkristallisation

Ein weiteres Porin, dessen dreidimensionale Struktur im Rahmen dieser Arbeit aufgelöst werden sollte, war das Porin OmpP2 aus *H. influenzae*. Die Proteinreinigung erfolgte zu Beginn nach dem bereits etablierten Protokoll für die Reinigung von PorB_{W135} (Tanabe *et al.*, 2010) und schloss mit initialen Kristallisationsversuchen im 96-*well*-Format ab, wodurch über 2000 Konditionen mit unterschiedlichen Pufferbedingungen, Detergenzien und Proteinkonzentrationen bei Wachstumstemperaturen von 16°C und 20°C getestet wurden. Dabei konnte festgestellt werden, dass das Protein nach Anwendung dieses Reinigungsprotokolls starke Proteinaggregation und ein sehr eingeschränktes Kristallwachstum zeigte. Des Weiteren konnte keine der etwa zehn initialen Proteinkristallwachstumsbedingungen im 24-*well*-Maßstab reproduziert werden. Erst nach Optimierung der Reinigungsstrategie, in welcher unter anderem die Salz- und Harnstoffkonzentration verändert wurden (2.3.3 und 3.1.1), konnte ein stabileres Protein mit erhöhter Thermostabilität erhalten werden (Abb. 3.1). Die Stabilitätserhöhung zeigte sich in symmetrischeren SEC-Peaks und keinem Konzentrationsverlust während einer Inkubation bei 4°C über fünf Tage. Daraufhin wurden erneut 24-*well*-Kristallisationsansätze mit den *screening*-Kits MemPlus, Memgold 1 und 2, Wizard 1-4 (Molecular Dimensions, Suffolk, UK; Rigaku, Shibuya, Japan) mit jeweils unterschiedlichen Detergenzien (0,05% LDAO, 1% OG, 0,05% TDDG, 0,5% C₈E₄) und Proteinkonzentrationen (8-30 mg/ml) durchgeführt. Es konnten sechs Bedingungen mit streuenden Kristallen erhalten werden, wobei die drei besten Bedingungen gezeigt sind (Abb. 3.37A-C). Die Beugungsreflexe der Kristalle (Abb. 3.37A, B) zeigten eine Auflösung von 6-15 Å, wobei die Reflexanzahl für eine Indizierung zu gering gewesen ist. Die am besten streuenden Kristalle konnten mit der Bedingung von 1% OG als Detergens und MPD als Fällungsmittel mit Beugungsreflexen von über 2 Å erhalten werden (Abb. 3.37C, D). Nach etwa 5-6 Monaten wuchsen diese Kristalle bis zu einer maximalen Größe von etwa 150 µm. Die Auflösung der Struktur zeigte eine signifikante Gleichheit mit der Molekülstruktur des Porins OmpF aus *E. coli*. Wie bereits erwähnt, war das aufgereinigte OmpP2-Protein mit OmpF kontaminiert (< 2%), wobei dieser Wert einer OmpF-Konzentration von max. 0,6 mg/ml (max. 30 mg/ml eingesetztem Protein während Kristallisation) im Kristallisationswell entspricht. Dieser Wert reichte somit aus, damit sich Nukleationskeime und letztendlich OmpF-Kristalle bildeten.

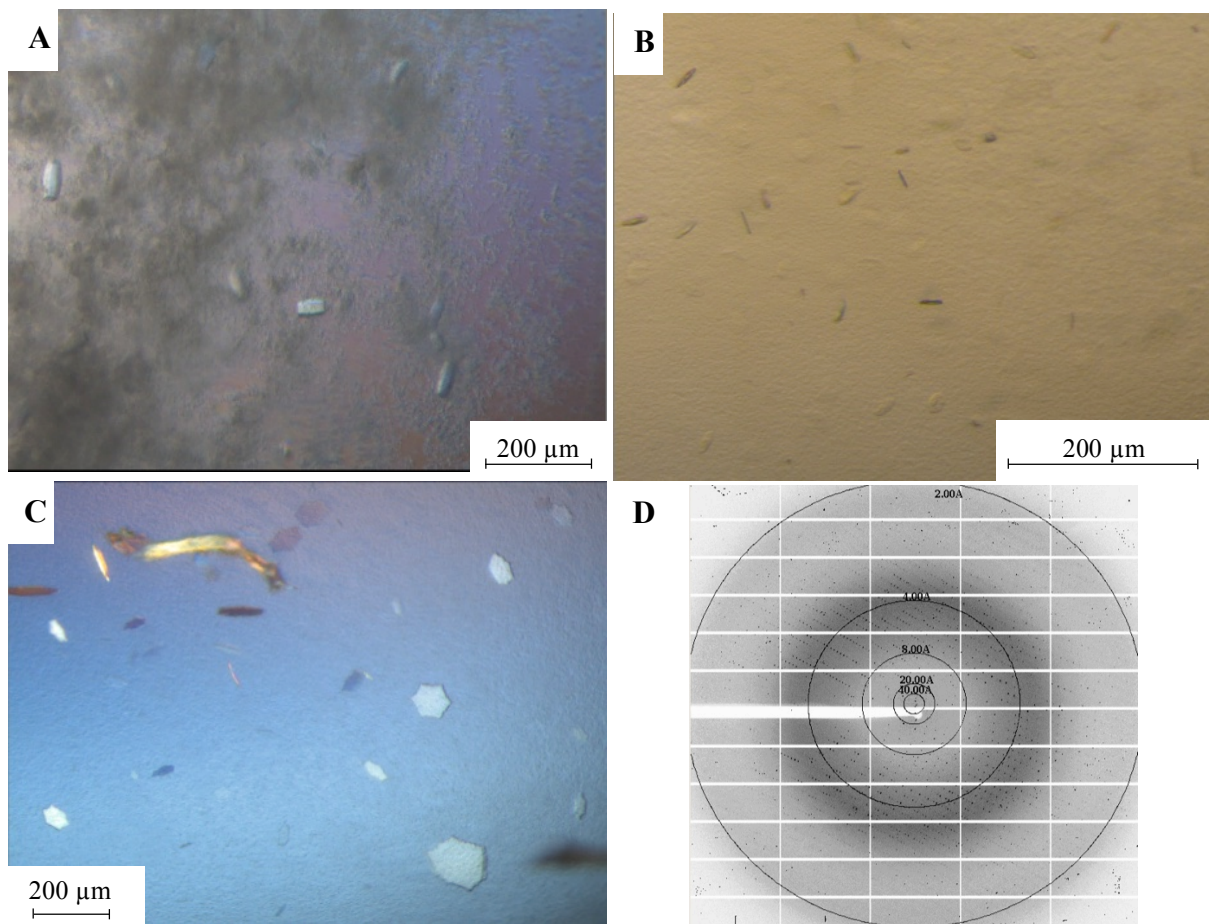


Abb. 3.37: Kristallwachstum und Kristallbeugungsreflexe. (A) 200 mM Calciumchlorid, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 44% PEG 400, 0,01% TDDG, OmpP2-Konzentration 30 mg/ml. Streuung bis max. 6 Å. (B) 50 mM Cäsiumchlorid, 100 mM HEPES pH 7,5, 39% Jeffamin M-600, 0,01% TDDG, OmpP2-Konzentration 30 mg/ml. Streuung bis max. 15 Å. (C) 500 mM Natriumacetat, 50 mM Tris-HCl/100 mM Imidazol pH 8,0, 25% 2-Methyl-2,4-pentandiol, 1% OG, OmpP2-Konzentration 21 mg/ml mit (D) aufgenommenem OmpP2-Streubild eines Kristalls dieser Bedingung mit maximaler Auflösung von über 2 Å.

3.5.2 Zuckertransport in OmpP2 nach Rekonstitution in Proteoliposomen

Wie bereits erwähnt, war OmpP2 nach Aufreinigung mit einem weiteren Kanalprotein, OmpF aus *E. coli* verunreinigt (3.1.2), obwohl für die Expression ein Porin-defizienter BL21(*DE3*)-Stamm eingesetzt worden ist. Die Erklärung dafür könnte eine zufällige Kontamination des Stammes mit einem kommerziell erhältlichen BL21(*DE3*)-Stamm sein. Um auszuschließen, dass die Transportanalyse durch das ebenfalls Zucker-transportierende OmpF-Porin nicht beeinflusst wird, wurde OmpP2 mit einem frisch angesetzten Porin-defizienten BL21(*DE3*)-Stamm neu exprimiert und aufgereinigt. Anschließend wurde diese neue Charge im Vergleich zur alten Charge (Positivkontrolle) mittels eines spezifischen anti-OmpF Antikörper

immunologisch analysiert. Dabei konnte eine OmpF-Kontamination nur für die alte Charge, aber nicht mehr in der neuen identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Der Transport wurde nachfolgend mit in Proteoliposomen rekonstituierten OmpP2-Porinen mittels Schwellungsassay analysiert (2.5). Aufgrund des im Vergleich zum PorB_{W135} (etwa 600 Da) deutlich größeren Ausschlussvolumens von 1.400 Da (Vachon *et al.*, 1985), erfolgte die Identifizierung der isoosmotischen Konzentration nicht mit Stachyose (667 Da), sondern mit Dextran T-3 (~ 3.000 Da) welches als Substrat theoretisch nicht mehr transportiert werden sollte. Die Auswertung des Assays (Abb. 3.38) zeigte einen Transport aller getesteten Einfach- bis Vierfachzucker durch den Porinkanal im Molekulargewichtsbereich von 180 Da (z.B. Glukose) bis 667 Da (Stachyose). Im Vergleich zum Maltosetransport, welcher im Assay (Abb. 3.38) die größte Transportrate zeigte, wurde Stachyose im Vergleich dazu mit einer etwa 17%-Effizienz transportiert. Des Weiteren wurde eine deutliche Zunahme des Zuckertransportes mit abnehmendem Molekulargewicht des Substrates beobachtet, wobei der Transport von Raffinose (505 Da) bereits etwa dem Dreifachen von Stachyose entsprach und im Vergleich zu Maltose etwa 55% aufwies. Interessanterweise konnte kein Unterschied in der Transportqualität von Zweifach- und Einfachzuckern gesehen werden, obwohl ihr Größenunterschied etwa 192 Da betrug.

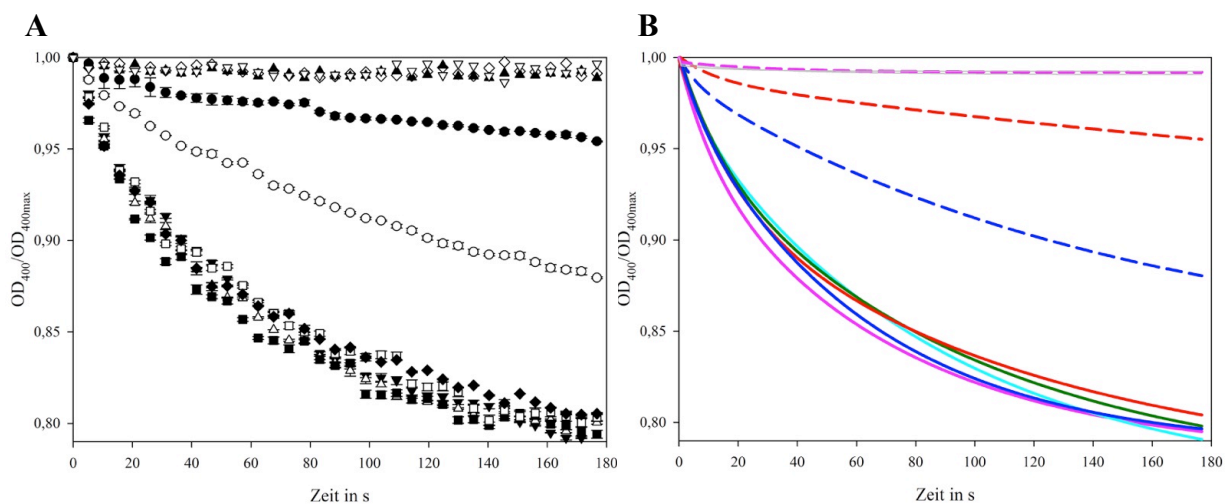


Abb. 3.38: Zuckertransport in OmpP2-Proteoliposomen. Die durch den Transport von Zucker induzierte Schwellung der PorB-Proteoliposomen, wird nach Verdünnung in eine 60 mM-Zucker-Stammlösung (jeweiliger Zucker ist angegeben) in Abhängigkeit der Absorptionsintensität bei 400 nm dargestellt. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. (A) Rohdaten. (B) Angepasste Kurven nach exponentieller Annäherung. Stachyose (●/---), Raffinose (○/---), Maltose (▼/—), Saccharose (Δ/—), Glukose (■/—), Galaktose (□/—), Rhamnose (◆/—), Dextran T-3 (◇/---), Glukose in Porin-freien Liposomen (▲/—), Maltose in Porin-freien Liposomen (▽/—).

3.6 FomA aus *Fusobacterium nukleatum*

3.6.1 Proteinkristallisation

Das Porin FomA aus *F. nukleatum* wurde ebenfalls als Ligand für den Toll-like Rezeptor 2 identifiziert (Toussi *et al.*, 2012a) und sollte daher im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf zukünftige Interaktionsstudien kristallisiert und strukturell aufgeklärt werden. Die Kristallisation erfolgte mit 24-well-Kristallisationsplatten der *screening*-Kits MemPlus, Memgold 1 und 2, Wizard 1-4, mit jeweils unterschiedlichen Detergenzien (0,1% LDAO, 1% OG, 0,01% TDDG, 0,5% C₈E₄) und Proteinkonzentrationen (10-30 mg/ml). Es konnten zwei Bedingungen identifiziert werden, die reproduzierbare Kristalle lieferten (Abb. 3.39A, B). Mit diesen Kristallen konnten Beugungsreflexe von bis zu 20 Å (Abb. 3.39A) bzw. bis zu 3,0 Å (Abb. 3.39B, C) erhalten werden. Die maximale Wachstumsgröße wurde nach einer Zeitperiode von zwei Monaten mit bis zu 20 µm großen Kristallen erreicht. Die Kristalle der zweiten Bedingung (Abb. 3.39B) lieferten prozessierbare Daten. Nach Auflösung der Kristallstruktur konnte aber auch hier eine signifikante Strukturgleichheit zu dem Porin OmpF aus *E. coli* festgestellt werden, sodass davon auszugehen ist, dass es sich bei den hier gewachsenen Kristallen (Abb. 3.39) um OmpF-Kristalle handelt.

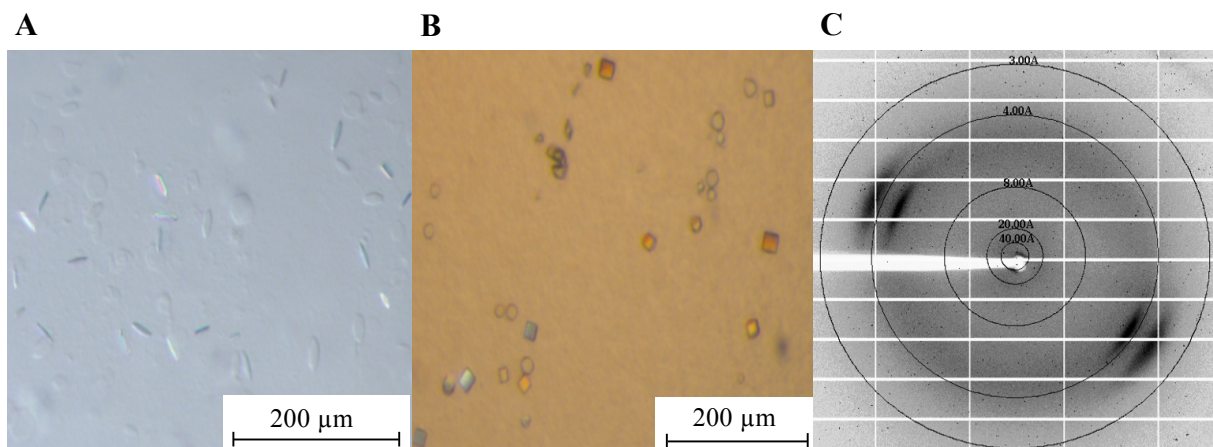


Abb. 3.39: Kristallwachstum in unterschiedlichen Bedingungen. (A) 50 mM Cäsiumchlorid, 100 mM HEPES pH 7,5, 39% Jeffamin M-600, 0,01% TDDG, FomA-Proteinkonzentration 30 mg/ml. Streuung bis max. 20 Å. (B) 200 mM Magnesiumchlorid, 100 mM Imidazol pH 8,0, 35% 2-Methyl-2,4-pentandiol, 1% OG, FomA-Proteinkonzentration 20 mg/ml. (C) Aufgenommenes FomA-Streubild eines Kristalls mit maximaler Auflösung von 3 Å.

3.6.2 Zuckertransport in FomA nach Rekonstitution in Proteoliposomen

Um eine Verfälschung der Transportmessung zu verhindern, wurde äquivalent zu 3.5.2 eine neue FomA-Proteincharge exprimiert und aufgereinigt. Die Proteinprobe wurde dementsprechend immunologisch auf das Vorhandensein von OmpF hin untersucht, wobei eine Kontamination ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Trotz seiner geringen Sequenzähnlichkeit zu „klassischen“ Porinen, zeigte das FomA die Eigenschaften eines trimeren Diffusionsporins (Bakken *et al.*, 1989; Bolstad *et al.*, 1994). Durch Aufnahme eines Schwellungsassays von mit FomA-rekonstituierten Proteoliposomen, sollte die Transportfunktion im Folgenden näher analysiert werden (Abb. 3.40). Die Auswertung des Assays (Abb. 3.40) zeigte einen Transport für alle eingesetzten Einfach- bis Vierfachzucker in einem Molekulargewichtsbereich von 180 Da - 667 Da, wobei ein Transport von Dextran T-3 (benutzt für die Bestimmung der isoosmotische Konzentration) nicht mehr erfolgte. Es bestand kein Unterschied in der Transporteffizienz von Einfach- bis Dreifachzuckern, sodass davon ausgegangen werden könnte, dass 505 Da deutlich unterhalb der Größenausschlussgrenze liegt und es bis zu diesem Molekulargewicht wahrscheinlich zu keinen intensiven Interaktionen innerhalb des FomA-Kanals kommt. Stachyose (667 Da) zeigte dabei die Hälfte der Transporteffizienz der Einfachzucker.

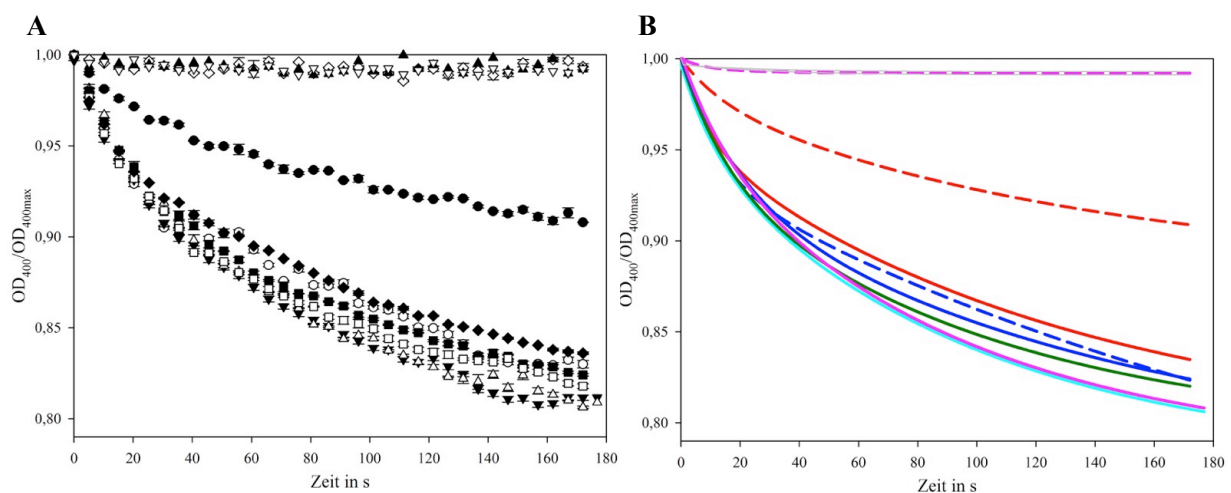


Abb. 3.40: Zuckertransport in FomA-Proteoliposomen. Die durch den Transport von Zucker induzierte Schwellung der FomA-Proteoliposomen, wird nach Verdünnung in eine 60 mM-Zucker-Stammlösung (jeweiliger Zucker ist angegeben) in Abhängigkeit der Absorptionsintensität bei 400 nm dargestellt. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. (A) Rohdaten. (B) Angepasste Kurven nach einer exponentiellen Annäherung. Stachyose (●/---), Raffinose (○/---), Maltose (▼/—), Saccharose (△/—), Glukose (■/—), Galaktose (□/—), Rhamnose (◆/—), Dextran T-3 (◇/---), Glukose in Porin-freien Liposomen (▽/—), Maltose in Porin-freien Liposomen (▲/—).

4 Diskussion

4.1 Vergleich mit weiteren Membranproteinen äußerer Membranen

Porine der äußeren Membran gramnegativer Bakterien weisen in der Regel weitestgehend Sequenzidentität innerhalb der β -barrel-Transmembrandomänen auf und eine hohe Variabilität der extrazellulären *loop*-Regionen (Nikaido, 2003), wobei dadurch häufig ein ähnlicher Strukturaufbau generiert wird. Zusätzlich haben die Transmembrandomänen im Vergleich zu den *loop*-Bereichen eine relativ steife Struktur mit niedrigeren B-Faktoren. Die hier gezeigte PorB_B-Struktur (Abb. 3.19) weist ebenfalls diese für Porine charakteristische Ordnung auf, wobei die oberflächenexponierten *loops* (mit Ausnahme von L2-L3) im Vergleich zur gesamten Struktur (B-Faktor \emptyset : 56,6) eine signifikant höhere Flexibilität (B-Faktor \emptyset : 91,6) aufweisen (Abb. 3.21C, Abb. 4.1A).

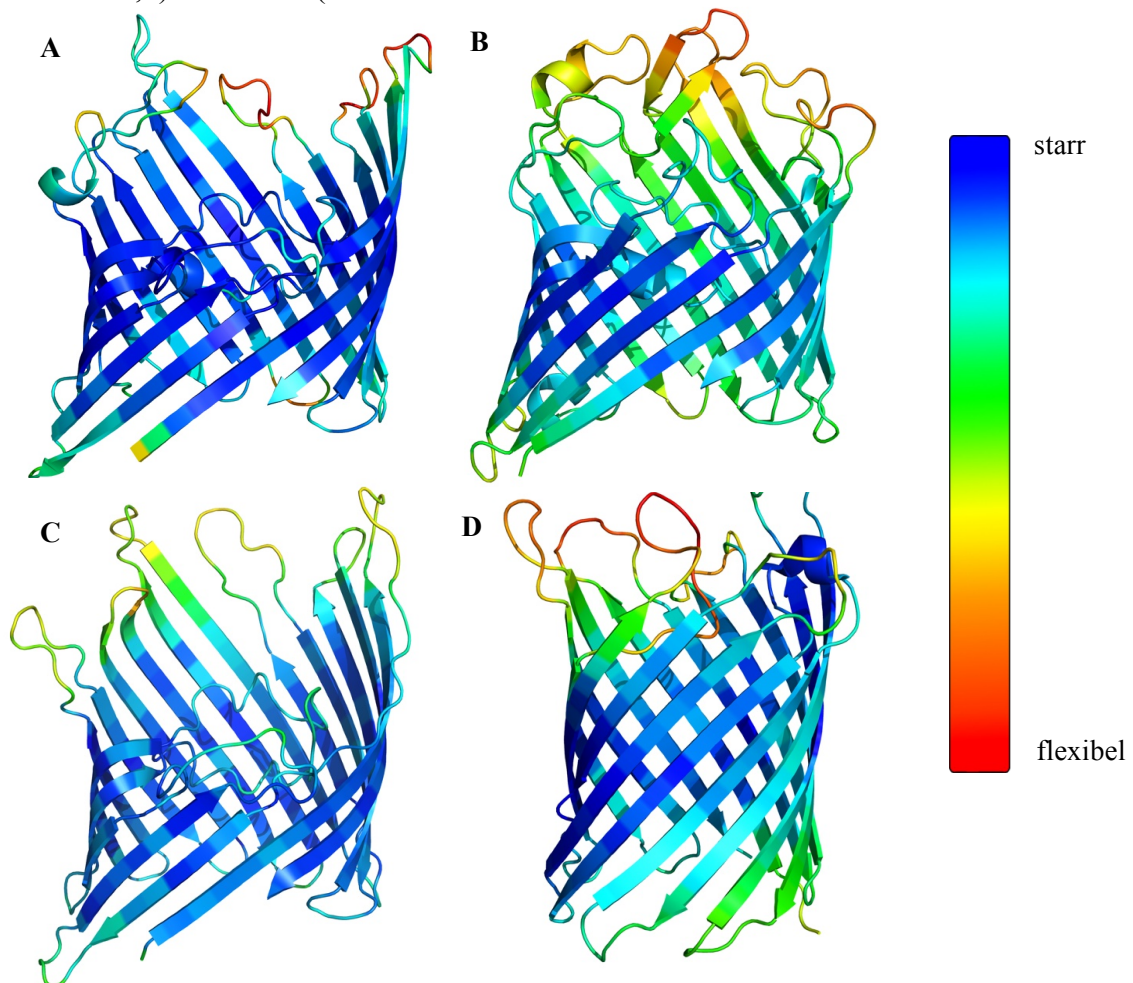


Abb. 4.1: Darstellung von B-Faktoren verschiedener Porine. Die Strukturen von (A) PorB_{AKR}, (B) OmpF (2ZFG, Yamashita *et al.*, 2008), (C) PorB_{gon} (4AUI, Zeth *et al.*, 2013) und (D) OmpG (2IWW, Yldiz *et al.*, 2006) sind in *cartoon*-Darstellung gezeigt und entsprechend ihrer B-Faktoren eingefärbt. Die Farbskala von blau (starr) bis rot (flexibel) zeigt die unterschiedliche Flexibilität der einzelnen Bereiche an.

Dies korreliert mit bereits bekannten Porinstrukturen wie OmpF und OmpG aus *E. coli* oder dem PorB aus *N. gonorrhoeae* (Yamashita *et al.*, 2008; Yildiz *et al.*, 2006; Zeth *et al.*, 2013) (Abb. 4.1B-D) und setzt sich in weiteren Porinen mit acht, 12, 18 oder 22 β -Faltblattsträngen fort (Pautsch und Schulz, 2000; Vandeputte-Rutten *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1997; Ferguson *et al.*, 2002). Der Grund für diesen Effekt liegt dabei hauptsächlich in der festen Einbettung der Transmembrandomäne innerhalb der Lipiddoppelschicht bzw. des stabilisierenden Effektes auf hydrophobe Proteinreste in einer Detergens-Mizelle, während die *loop*- und *turn*-Bereiche exponiert vorliegen und somit frei beweglich sein können.

Die hohe Porin-Sequenzhomologie führt aber nicht zwangsläufig zu einer gleichen Funktion. Obwohl die Identität der Aminosäuresequenz zwischen den Porinen OmpF und OmpC aus *E. coli* 77% beträgt, zeigen beide Proteine teilweise unterschiedliche Funktionen. Während OmpF über eine höhere Leitfähigkeit verfügt und einen größeren Durchfluss von Metaboliten erlaubt, hat OmpC einen engeren Kanal, benötigt eine zweifach höhere Spannung zur Kanalschließung und wird hauptsächlich bei einem hohen osmotischen Stress bzw. bei höheren Temperaturen exprimiert (Pratt *et al.*, 1996; Nestorovich *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2010).

Nichtsdestotrotz führt diese Sequenzhomologie häufig zur Ausbildung einer charakteristischen Ladungstrennung innerhalb der Engstelle des Porinkanals, die sich fast durchgehend durch die Pore zieht und von L3 maßgeblich definiert wird (Abb. 1.6). Diese strikte Ladungstrennung kann in den meisten bakteriellen Diffusionsporinen, aber auch im mitochondrialen *voltage dependent anion channel* (VDAC), welcher zu bakteriellen Porinen strukturell und funktionell verwandt ist, identifiziert werden (Tanabe *et al.*, 2010; Rui *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). Darüber hinaus hat diese Ladungstrennung einen wesentlich Einfluss auf den Transport und wird als Grund für die häufig existierende, separate Translokation von Anionen und Kationen durch den Kanal gesehen (Kutzner *et al.*, 2011; Im und Roux, 2002; Roux *et al.*, 2004). Das Porin Omp32, dessen Kanalengstelle hauptsächlich positiv geladen ist und eine signifikante Anionenselektivität aufweist, stellt in diesem Zusammenhang eine Ausnahme dar (Zachariae *et al.*, 2006). Die Ausbildung dieses starken, transversalen elektrischen Feldes, wird dabei nur durch eine geringe Anzahl positiv und negativ geladener Aminosäuren in der Konstriktion gebildet. Während beispielsweise in OmpF die Aminosäuren R42, R82 und R132 einen positiv geladenen Arg/Lys-Cluster an der β -barrel-Wand bilden (Yamashita *et al.*, 2008), sind dies in PorB_{W135} K42, R77 und R130 (Tanabe *et al.*, 2010) und in PorB_B K41, R76 und R125 (Abb. 4.2A).

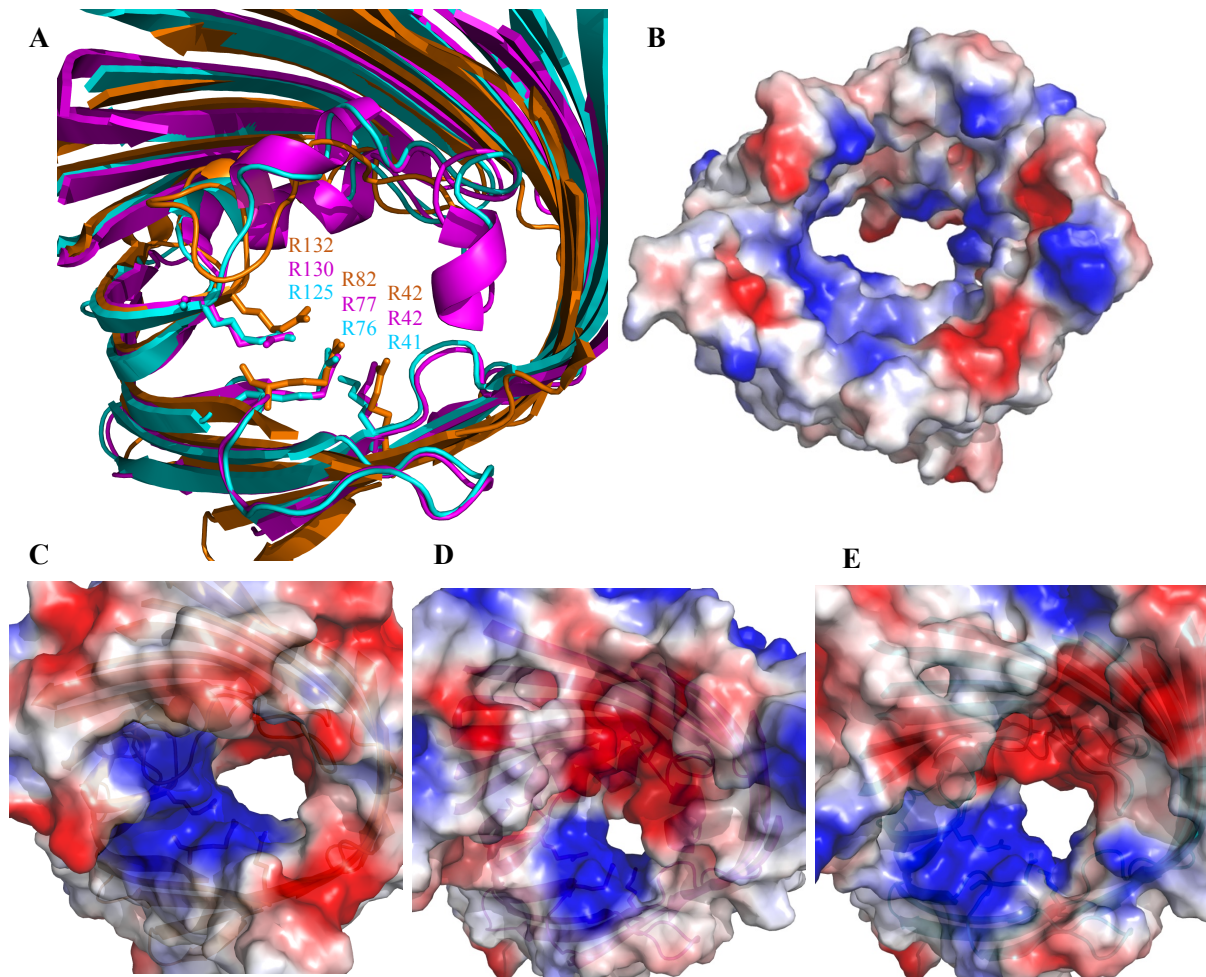


Abb. 4.2: Ladungsverteilung im Kanal bakterieller Porine sowie dem murinen VDAC. (A) Gezeigt sind die positiv geladenen Reste des Arg/Lys-Clusters innerhalb der Porinkanäle von OmpF (orange, 2ZFG, Yamashita *et al.*, 2008), PorB_{W135} (magenta, 3A2R, Tanabe *et al.*, 2010) und PorB_{AKR} (cyan). Der charakteristische Arg/Lys-Cluster verursacht zusammen mit gegenüberliegenden negativ geladenen Aminosäuren am L3 eine strikte Ladungstrennung im Porinkanal. (B) Die elektrostatische Oberfläche des murinen VDAC (4C69, Choudhary *et al.*, 2014), (C) OmpF, (D) PorB_{W135} und (E) PorB_{AKR} ist mit dem *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS, Baker *et al.*, 2001) berechnet und von der extrazellulären Seite gezeigt. Bereiche mit positivem Potential sind blau, Bereiche mit negativem Potential rot dargestellt und von $-20kT/e$ bis $+20kT/e$ konturiert.

Den extrazellulären *loops* wird eine Funktion in der Anziehung von Ionen attestiert, welche in PorB, OmpF, OmpC oder OmpG charakteristischerweise verschieden sind. Diese kleinen Unterschiede scheinen zusätzlich mit der im Kanal herrschenden Ladungstrennung gemeinsam zu wirken und so eine unterschiedliche Translokation von Anionen und Kationen zu induzieren (Tanabe *et al.*, 2010).

Der Vergleich mit dem mitochondrialen VDAC zeigt, dass im Gegensatz zum L3 in bakteriellen Porinen hier die N-terminale Helix, welche in den Kanal faltet, die Kanalaktivität reguliert (Colombini *et al.*, 2004; Zachariae *et al.*, 2012). Dabei scheinen die Leitfähigkeitseigenschaften von VDAC nicht durch sein elektrisches Feld innerhalb des

Kanals bestimmt zu werden (Abb. 4.2B), sondern mehr durch eine synergistische Zusammenarbeit von geladenen Aminosäuren außerhalb des β -barrels mit Lipid-gesteuerten Effekten (Villinger *et al.*, 2010).

4.2 Einfluss des Ionentransportweges in PorB

Die Positionen der in der PorB_{W135}-Kristallstruktur identifizierten Cäsiumionen Cs1, Cs3 und Cs4 zeigten eine gute Übereinstimmung mit Cs⁺-Bindestellen, die in moleküldynamischen Simulationen identifiziert wurden (3.2.2). Kristallographische Untersuchungen von PorB_{W135}-Kristallen im CsCl-freien Kristallisationspuffer konnten an den Cs⁺-Positionen keine Elektronendichten identifizieren, wobei diese Stellen in Kristallen ohne CsCl zum größten Teil von Wassermolekülen besetzt gewesen sind.

Die Positionen von Cs3 und Cs4 sind im Vergleich zur Simulation etwas versetzt, was eventuell mit der Flexibilität der Seitenketten während der Simulation erklärt werden könnte. Im Vergleich zu den Kationen Cs1, Cs3 und Cs4 ist die Position von Cs2 nicht in der Simulation identifiziert worden. Eine Erklärung hierfür könnte im Ablauf der Simulation selbst liegen, in welcher nur eine begrenzte Laufzeit gewählt werden konnte, wobei diese Position möglicherweise während einer längeren Messzeitperiode identifiziert worden wäre. Andererseits könnte die kristallographisch identifizierte Bindung von Cs2 auch nur bei niedrigen Temperaturen zu einer Interaktion geführt haben.

Die Cs⁺-Kationen zeigten in der Kristallstruktur Flexibilität, mit höheren B-Faktoren im Vergleich zum gesamten Proteinmolekül (A.2). Aufgrund des passiven Transportes innerhalb von Porinkanälen, werden Substrate möglicherweise nur mit geringen Besetzungsgraden (*occupancy*) transportiert, wobei hohe B-Faktoren teilweise nur schwache oder unscharfe Dichten erzeugen. Ähnlich zu den hier gezeigten komplexierten Cäsiumkationen und Zitrat-Molekülen (A.2, A.7), konnten im Vergleich zum Durchschnittswert des Proteins höhere B-Faktoren sowie niedrigere *occupancy*-Werte bereits sehr häufig in komplexierten Kristallstrukturen von anderen Porinen (wie z.B. OmpF) identifiziert werden (Balasubramaniam *et al.*, 2012; Dhakshnamoorthy *et al.*, 2010).

Obwohl Porine als passive Diffusionskanäle mit einer geringen Selektivität bzw. dem Nichtvorhandensein spezifischer Ionenbindestellen charakterisiert werden (Nikaido, 2003), zeigen die Ergebnisse, dass PorB durchaus eindeutige Bindestellen zumal für Kationen aufweist, sowie über separate Wege für Anionen und Kationen verfügt. Solche spezifischen

Ionenbindestellen konnten auch innerhalb des OmpF-Kanals identifiziert werden (Dhakshnamoorthy *et al.*, 2013), wodurch separate Wege für Kationen und Anionen mit spezifischen Bindestellen durchaus charakteristisch für einige Porine zu sein scheinen.

Der Ionenfluss durch den PorB-Kanal hat nicht nur für das bakterielle Überleben eine immens wichtige Funktion, sondern auch Auswirkungen auf die Pathogenität von *Neisseria*. Nach Invasion und erfolgter PorB-Translokation in die innere Mitochondrienmembran, erfolgt die Bildung eines funktionellen Kanals, wobei aufgrund der hohen Nukleotid-Konzentration im Mitochondrium ATP aber auch weitere Moleküle wie GTP und AMP nicht-kovalent im Kanal gebunden werden können. Obwohl PorB für gewöhnlich unter höheren Transmembranspannungen (über 60 mV) eher eine geschlossene Konformation hat, wird durch die Bindung der Nukleotide hauptsächlich eine offene Konformation bevorzugt und das trotz eines herrschenden Transmembranpotentials von 150 mV in der inneren Mitochondrienmembran. (Massari *et al.*, 2000; Kozjak-Pavlovic *et al.*, 2009). Die ATP-gebundene, offene PorB-Konformation erlaubt auf diese Weise einen starken Fluss von Ionen, wobei dieser untypische Ionenfluss Auswirkungen auf das im Mitochondrium herrschende Potential hat. Dieser unkontrollierte Fluss führt höchstwahrscheinlich zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, welcher wiederum ein verändertes Apoptoseverhalten in der infizierten Zelle induziert.

Die initiale Struktur von PorB_{W135} wurde im Komplex mit dem ATP-Analogen AMP-PNP kristallisiert (Tanabe *et al.*, 2010). Das Molekül ist in einer festen Bindung innerhalb der Kanalengstelle zwischen $-10 < z < 4$ und $0 < x < 6$ lokalisiert, wodurch es sich inmitten des hier identifizierten Anionen-Translokationsweges befindet (Abb. 4.3).

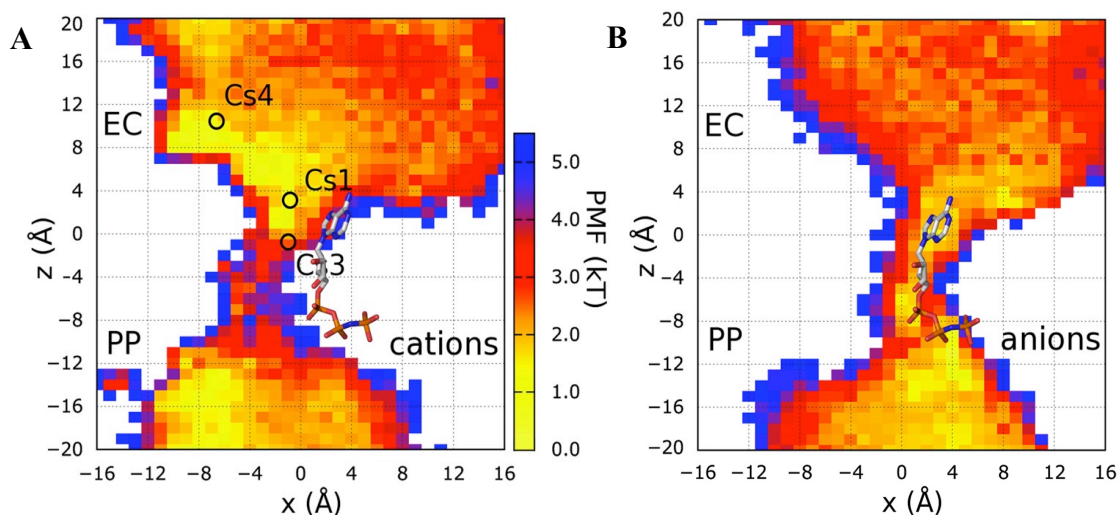


Abb. 4.3: Position von AMP-PNP im Ionen-Translokationsweg von PorB_{W135}. Gezeigt ist die Position von AMP-PNP in der 2D-PMF-Karte, berechnet durch MD-Simulationen (Tanabe *et al.*, 2010) im (A) Cs⁺- und (B) Cl⁻-Translokationsweg. Die Karten und Koordinaten sind äquivalent zur Abb. 3.17 gezeigt.

Dadurch ist es wahrscheinlich, dass bei einer PorB-Translokation in die Mitochondrienmembran der Anionenweg geblockt und die Kanalselektivität stark gegenüber Kationen verschoben wird. Dieser Effekt konnte bereits für PorB_{gon} beschrieben werden, wodurch die Bindung von ATP und GTP im Kanal ebenfalls die Selektivität von Kationen verstärkte (Rudel *et al.*, 1996), obwohl für freies PorB eher eine leichte Anionenselektivität angenommen wurde (Jadhev *et al.*, 2012). Es kann somit vermutet werden, dass der beschriebene Verlust des Transmembranpotentials und letztendlich die resultierende Zellapoptose eine Auswirkung der Kationenselektivität im mitochondrienmembran-gebundenen Zustand ist und die Leitfähigkeit von PorB im Nukleotid-gebundenen Zustand hauptsächlich auf dem Transport von Kationen beruht.

Die hier aufgeklärte Struktur von PorB_{AKR} mit komplexierten Ziträt-Molekülen (Abb. 3.20) könnte ein weiterer Effekt im Zusammenhang mit der pathogenen Wirkung von PorB sein, wobei eine untypische Ziträt-Translokation aus den Mitochondrien dem Zitratzyklus seinen initialen Metaboliten entziehen würde, womit ein effektiver Ablauf dieses Zykluses nicht mehr gewährleistet werden könnte.

Neben der Translokation von PorB in die Mitochondrienmembran ist seine Translokation in die Plasmamembran des Wirtes nach neisserialer Invasion ebenfalls belegt. Dabei wird ein funktioneller PorB-Kanal innerhalb der Membran gebildet (Lynch *et al.*, 1984; Blake und Gotschlich, 1987; Rudel *et al.*, 1996). Diese PorB-Lokalisation hat wahrscheinlich sehr ähnliche Auswirkungen auf den regulären Ionenstrom im Wirt wie seine Präsenz in der Mitochondrienmembran, wodurch ebenfalls ein starker Austausch von Ionen induziert wird. Ungewöhnliche Änderungen von Ionenkonzentrationen haben dabei nicht nur Auswirkungen auf das Membranpotential, sondern ebenfalls auch auf die Funktion zytosolischer Proteine. Dabei konnte nach PorB-Translokation in die Plasmamembran von Epithelzellen ein starker Anstieg an zytosolischen Calciumionen (Ca²⁺) extrazellulären Ursprungs festgestellt werden, wodurch die Ca²⁺-abhängigen Proteasen Calpain, sowie die Proteasen der Caspase-Familie aktiviert wurden (Müller *et al.*, 1999), welche eine wichtige Rolle in der Induktion der Zellapoptose spielen (Squier *et al.*, 1994; Cryns *et al.*, 1996). Typische apoptotische Verhaltensmuster wie Zellschrumpfung, DNA-Abbau, Chromatinkondensation oder die Bildung von Membranvesikeln (*blebbing*) konnten beobachtet werden (Müller *et al.*, 2000).

Im Zusammenhang mit Apoptose wird der Zusammenbruch des Transmembranpotentials der inneren Mitochondrienmembran häufig mit der Öffnung des MPT-Komplexes (*mitochondrial permeability transition pore*) assoziiert, wodurch Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird (Zoratti und Szabo, 1995; Green und Reed, 1998). Interessanterweise wird

die Öffnung des MPT dabei durch pro-apoptotische Faktoren, wie auch durch transient hohe Ca^{2+} -Konzentrationen gesteuert (Bernardi und Petronilli, 1996; Marzo *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang konnte eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol bereits als Folge einer PorB-Translokation in die äußere Mitochondrienmembran identifiziert werden, verbunden mit einem kompletten Verlust des Membranpotentials (Müller *et al.*, 2002). Es ist bekannt, dass Cytochrom C als Co-Faktor in einem Komplex mit Apaf-I und dATP zur Aktivierung von Caspase-9 benötigt wird. Caspase-9 spielt, genauso wie Caspase-8, eine Schlüsselrolle in der Initialisierung des programmierten Zelltodes durch Fragmentierung wichtiger Proteine wie PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1), des Zytoskelett-assoziierten Proteins Fodrin, aber auch der Aktivierung weiterer Caspasen (Cryns *et al.*, 1996; Janicke *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1997; Slee *et al.*, 1999). Die Freisetzung von Cytochrom C könnte dabei nicht nur die Folge eines Anstieges der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sein, sondern ebenfalls die Reaktion einer direkten Bindung von PorB an VDAC oder des MPT-Komplexes in der Mitochondrienmembran. Dadurch zeigt VDAC selbst oder der MPT-Komplex eine modifizierte Kanalöffnung bzw. -schließung, mit der Folge des Aufbaus eines unnatürlichen mitochondrialen Membranpotentials (Colombini *et al.*, 1996). Dabei scheint es, als könnte *Neisseria* das Apoptoseverhalten des Wirtes durch die Interaktion zwischen VDAC und PorB steuern, da als Ergebnis dieser Bindung ebenfalls anti-apoptotische Effekte berichtet wurden (Massari *et al.*, 2000; Follows *et al.*, 2009).

4.3 Der Antibiotikatrtransport in bakteriellen Porinen

Die Analyse des Antibiotikatrtransportes in PorB_{W135}-G103-Mutanten (Abb. 3.13 und 3.14), konnte die Position Gly103 in *loop 3* als eine Schlüsselstelle im Antibiotikatrtransport von N_{men} identifizieren. Der Austausch von Asp103 gegen die basische Aminosäure Lysin bzw. Arginin führte zu einer Verringerung der Translokation von Ampicillin sowie Penicillin G um etwa 50% im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.13 und 3.14). Diese Ergebnisse korrelieren dabei sehr gut mit den Analysen der äquivalenten Position Gly120 in PorB_{gon} (Olesky *et al.*, 2002, 2006). Auch hier konnte ein einzelner Lysin-Austausch den Transport um etwa 50% verringern. Dabei wurde diskutiert, dass die Mutation an Position 120 im L3 die Konformation dieses *loops* verändert und somit ein möglicher Grund für den verlangsamten Transport sein könnte. Dies konnte für PorB_{W135} anhand der aufgelösten G103K- und G103D-

Kristallstrukturen (Abb. 3.16) nicht bestätigt werden. Zwar erfolgte möglicherweise eine Konformationsänderung der Position 104 in den Strukturen von G103D sowie G103K im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.16), allerdings hatte diese strukturelle Änderung keine großen Auswirkungen auf die Konformation des gesamten L3.

Der hier ermittelte, verringerte Transport von Antibiotika als Auswirkung eines Austausches an der Position 103, könnte durch eine sterische Hinderung oder auch durch die veränderte elektrostatische Ladung im Kanal erfolgt sein. Im Vergleich zur kurzen Glyzinseitenkette an der Position 103, haben alle eingeführten Aminosäuren eine längere Seitenkette, wodurch die Translokation angesichts einer intensiveren Wechselwirkung oder einer sterischen Blockade verlangsamt werden könnte. Dieses Argument belegen die Transportassays (Abb. 3.13 und 3.14), in welchen die Abnahme der Translokation des Substrates zum größten Teil mit zunehmender Seitenkettenlänge an Position 103 korreliert. Dieser Effekt konnte ebenfalls beim Transport in PorB_{gon}-Mutanten gesehen werden, in welchen die Antibiotikatranslokation in der Reihenfolge G120H, G120E und G120K abnahm (Olesky *et al.*, 2002).

Elektrostatische Auswirkungen können aufgrund des nicht vollständig aufgelösten Lysin- und Aspartatrestes an der Position 103 in den Strukturen von G103K und G103D nicht diskutiert werden. Dennoch könnte es vor allem aufgrund des Einfügens der positiv geladenen Lysinseitenkette zu elektrostatischen Auswirkungen kommen, da sich das Lys103 am L3 in einem weitestgehend negativ geladenen Bereich befindet. Dadurch könnte möglicherweise die strikte Ladungstrennung in diesem Bereich der Engstelle aufgehoben werden und dieser Abschnitt durch einen komplett geschlossenen Ring positiv geladener Seitenketten ersetzt werden. Durch die stellenweise Aufhebung der strikten Ladungstrennung und dem Aufbau eines nahezu komplett geschlossenen, positiv geladenen Ringes, könnte die Anziehung und auch die Translokation von Anionen gegenüber Kationen stark begünstigt werden.

Untersuchungen der Permeabilität verschiedener Klassen von antibiotisch-wirkenden Molekülen zeigte für OmpF, dass die strikte Ladungsverteilung in der Kanalengstelle wesentlich zum Transport des Antibiotikums beiträgt (Nestorovich *et al.*, 2002). Am Beispiel von Ampicillin konnte belegt werden, dass die Ladungsverteilung im zwitterionischen Ampicillin-Molekül die Ladungsverteilung in der Konstriktionszone ergänzt, wodurch ein erleichterter Durchtritt und somit ebenfalls eine erhöhte Permeabilität gewährleistet wurde. Zwar wurden diese Untersuchungen nicht mit dem PorB-Porin durchgeführt, doch aufgrund vergleichbarer Ladungsverteilung könnte dies zu einem ähnlichen Effekt führen. Dadurch lässt sich argumentieren, dass der Durchtritt zwar mit zunehmender Seitenkettenlänge an der Position 103 verlangsamt wird, allerdings dieser Effekt mit einer entsprechend langen und

positiv geladenen Seitenkette durch die Aufhebung der Ladungsverteilung zusätzlich verstärkt werden könnte. Dies lässt sich gut am Vergleich des Transportes in den Varianten G103K, G103M und G103R veranschaulichen. Obwohl die Seitenkette des Methionins in etwa mit denen von Lysin und Arginin verglichen werden kann, inhibiert die neutrale Methionin-Mutation den Transport nur um etwa 30% (Arginin/Lysin jeweils um 50%).

Ein möglicher Einfluss der Hydrophobizität kann trotz der starken Ladungstrennung innerhalb der Konstriktionszone nicht ausgeschlossen werden. Um diese Fragestellung näher erläutern zu können, müssten in Zukunft weitere Experimente mit anderen Substraten unterschiedlicher Größe und Beschaffenheit oder Ladung durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang konnte aber bereits für OmpF, nicht aber für PorB_{gon}, eine gute Korrelation zwischen einer Zunahme des Antibiotikatransportes mit abnehmender Hydrophobizität analysiert werden (Yoshimura und Nikaido, 1985) (Olesky *et al.*, 2006).

Allgemein betrachtet kann dieser verlangsamte Transport, bedingt durch die Mutation an Position 103, als ein weiterer Resistenzmechanismus gegenüber Antibiotika angesehen werden, weil dadurch der Fluss der toxischen Substanzen aus der extrazellulären Umgebung ins bakterielle Periplasma und später ins Zytoplasma verringert wird.

Die hier diskutierte Auswirkung der Gly103-Mutation hat ihren Ursprung in der Identifizierung einer natürlichen Variante eines N_{gon}-Stammes. Diese später im *penB*-Lokus identifizierte Gly120-Mutation im L3 zeigte als Folge eine vermehrte Resistenz des Stammes gegenüber den Antibiotika Ampicillin und Tetrazyklin (Gill *et al.*, 1998). Dabei haben etwa 47% aller klinisch identifizierten N_{gon}-Varianten mit erhöhter Resistenz eine Lysin- bzw. Aspartat-Substitution an den Positionen 120 und/oder 121, was die Wichtigkeit dieser Position im Antibiotikatransport nochmals untermauert (Olesky *et al.*, 2002). Der Einfluss einer L3-Modifizierung auf die Antibiotikatranslokation konnte bereits zuvor in anderen natürlichen *Neisseria*-Varianten festgestellt werden, wobei nicht nur ein verringerter Antibiotikadurchfluss in den verschiedenen Porinen festgestellt wurde, sondern diese Varianten zusätzlich eine erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika zeigten (Misra und Benson, 1988, Dé *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 1998, Chevalier *et al.*, 1999). Dabei konnte eine Erhöhung der β -Laktam-Resistenz durch die Einführung einer sauren Aminosäure anstelle eines Glyzins (G119D bzw. G119E) im L3 von OmpF identifiziert werden (Simonet *et al.*, 2000; Bredin *et al.*, 2003)

Kristallstrukturen mit komplexierten Antibiotikamolekülen könnten eine Charakterisierung ihrer Translokation durch den PorB-Kanal erleichtern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Versuche unternommen, komplexierte PorB-Antibiotika-Strukturen zu erhalten. Dabei konnten nach *soaking*-Experimenten mit Ampicillin zwar zusätzliche Dichten innerhalb des PorB-Kanals identifiziert werden, die Bestätigung der Präsenz eines Ampicillin-Moleküls erfolgte allerdings nicht.

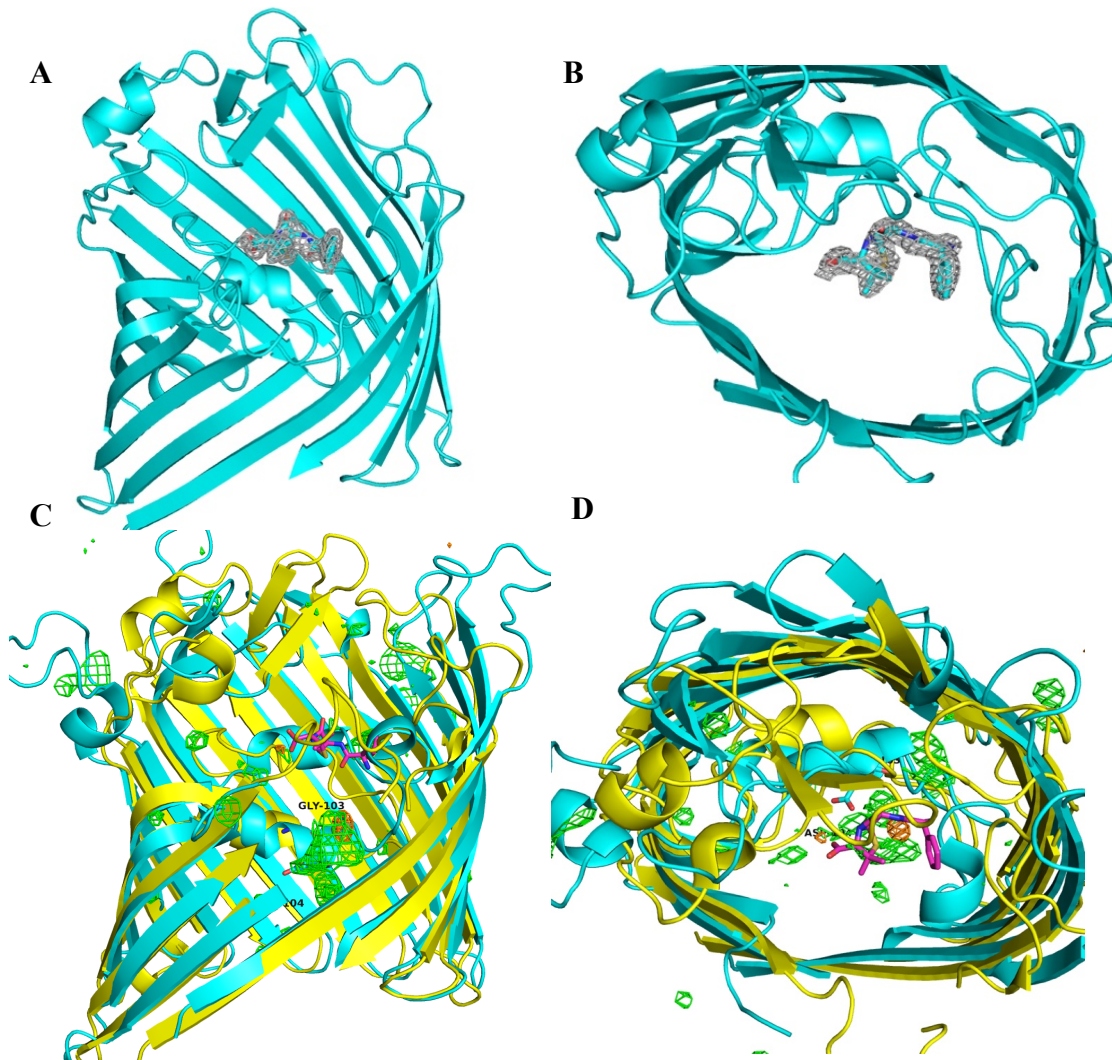


Abb. 4.4: Position von Ampicillin in *E. coli* OmpF und Vergleich mit PorB_{W135}. Das in OmpF (4GCP, Ziervogel *et al.*, 2013) komplexierte Ampicillin (C-Atome magenta, O-Atome rot, N-Atome blau) befindet sich nahe L3 im Porinkanal und ist von der (A) Membranseite und (B) extrazellulären Seite gezeigt. Die 2FoFc-Elektronendichte des Ampicillin-Moleküls ist dargestellt (1 σ , graues Gitter). Ein Alignment der Struktur von PorB_{W135}-D103G (*cartoon*-Darstellung in gelb; FoFc-Differenzelektronendichte, +3 σ , grünes Gitter) nach Ampicillin-*soaking* mit der Struktur von OmpF (*cartoon*-Darstellung in cyan) mit komplexiertem Ampicillin, soll die Positionen der Liganden innerhalb der Kanäle zeigen und ist von der (C) Membranseite und (D) extrazellulären Seite dargestellt. Gly103 ist in Stabdarstellung (C-Atome cyan, O-Atome rot) gezeigt.

Die gezeigte Kristallstruktur von OmpF im Komplex mit drei verschiedenen β -Laktam-Antibiotika wies eine starke und spezifische Bindung von Antibiotikamolekülen mit charakteristischen Bindestellen in der Konstriktionszone auf, wobei die Carboxylgruppe zur β -barrel Wand und die Ammoniumgruppe zum L3 orientiert gewesen sind. Die Präsenz von Ampicillin in OmpF hat dabei genauso wie das in 3.2.7 gebundene Molekül keine signifikanten Strukturänderungen in den umgebenden Resten induziert, wobei beide Moleküle zum L3 orientiert sind (Ziervogel und Roux, 2013) (Abb. 4.4).

Die Analyse des Antibiotikatransportes in PorB_{W135}-Varianten zeigte in den durchgeführten Assays (Abb. 3.13, 3.14) im Vergleich zum Wildtyp-PorB_{W135} eine etwas bessere Translokation des einfach-negativ geladenen Penicillin G gegenüber dem zwitterionischen Ampicillin. Daten aus *in vivo*-Experimenten belegten für OmpF, dass zwitterionische Moleküle mit einer Rate von etwa $10\text{-}50 \times 10^{-5}$ cm/s im Vergleich zu einfach und zweifach negativ geladenen Substraten (z.B. Carbenicillin) deutlich besser transportiert wurden (Nikaido *et al.*, 1983). Während die Durchflussrate für einfach-negativ geladene Moleküle stark von ihrer Hydrophobizität abhängte, wurden zweifach-negativ geladene Moleküle am langsamsten transportiert (Yoshimura und Nikaido, 1985). Dies konnten auch Leitfähigkeitsstudien in Kombination mit MD-Simulationen in OmpF bestätigen, in welchen spezifische Interaktionen mit zwitterionischen Molekülen (z.B. Ampicillin), nicht aber mit anionischen Substanzen in der Konstriktionszone aufgezeigt werden konnten (Danelon *et al.*, 2006; Nestorovich *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen würden somit möglicherweise im Gegensatz zu dem hier gemessenen Transport antibiotischer Moleküle stehen, wobei ein besserer Transport von zwitterionischen Molekülen gegenüber anionischen Molekülen für das PorB_{W135} nicht identifiziert werden konnte. Gleichzeitig muss allerdings erwähnt werden, dass die hier angewendete Liposomenschwellungsanalyse eine zu ungenaue Messmethode ist, um diese Fragestellung genauer untersuchen zu können, und moleküldynamische Analysen in diesem Zusammenhang die Methode der Wahl wären.

Des Weiteren zeigte die Bindung von Antibiotikamolekülen unterschiedliche Auswirkungen auf den simultanen Ionentransport in OmpF, wobei Ampicillin, nicht aber Carbenicillin den Ionentransport erheblich reduzierte (um das Siebenfache), aber auch komplett blockieren konnte (Ziervogel und Roux, 2013). Dabei wurde diskutiert, dass anionische Moleküle den Porin-Kanal nicht oder nur mit sehr geringen Durchflussraten überqueren und eine effiziente Translokation von spezifischen Bindestellen im Kanal abhängig ist (Danelon *et al.*, 2006; Ziervogel und Roux, 2013). Zusätzlich hatte die Präsenz von antibiotisch-wirkenden Stoffen im OmpF-Kanal Auswirkungen auf die Selektivität, wobei Carbenicillin die

Kationenselektivität erhöhte und sogar die Menge an Anionen reduzierte, welche am extrazellulären Ende den Kanal penetrierten. OmpF-Mutationsstudien zeigten ebenfalls, dass der an der β -barrel Wand lokalisierte, positiv geladene Arg/Lys-Cluster einen wesentlichen Einfluss auf die Translokation von Ampicillin hatte, wobei die Unterbrechung dieses Clusters durch eine neutrale Aminosäure die Resistenz des Bakteriums verstärkte (Ziervogel und Roux *et al.*, 2013).

Um Auswirkungen auf die Ionentranslokation bei gleichzeitiger Präsenz von Antibiotikamolekülen im PorB-Kanal zu untersuchen, erfolgten Leitfähigkeitsanalysen zur elektrophysiologischen Charakterisierung dieser Fragestellung. Parallel dazu sollte der Antibiotikatransport in den PorB_{W135}-Mutanten ebenfalls elektrophysiologisch untersucht werden. Die Ergebnisse konnten in diese Arbeit allerdings nicht mehr aufgenommen werden.

4.4 Vergleich verschiedener Transportwege in PorB

Die Kristallstruktur von PorB_{men} konnte bereits mit mehreren komplexierten Liganden aufgeklärt werden (Galaktose, Saccharose, AMP-PNP; Tanabe *et al.*, 2010). Dabei zeigte sich, dass die Bindungsstellen für beide Zuckermoleküle identisch waren, welche sich inmitten des positiv geladenen Arg/Lys-Clusters befinden (K9, K42, K340, R338), lokalisiert gegenüber von L3 an der β -barrel Wand.

Das ATP-Analogon AMP-PNP wird ebenfalls fast hauptsächlich von positiv geladenen Aminosäuren des Arg/Lys-Clusters (K41, R76, K100) aber auch von Seitenketten des L3 (E116 und R130) koordiniert. Die Bindungsstelle überlappt dabei mit der Zuckerbindungsstelle und liegt wie bereits erwähnt inmitten des Anionentransportweges (Abb. 4.5). Auch die komplexierte Struktur des PorB_{gon} mit ATP zeigte eine sehr vergleichbare Lage des Nukleotides im Kanal zu der Position des AMP-PNP in PorB_{men}. Auch hier erfolgt eine Koordination hauptsächlich durch positiv geladene Aminosäuren (K9, K40, K62, R75, K98, R124) (Abb. 4.5).

Die nach dem Ampicillin-*soaking* neu identifizierte Elektronendichte im Kanal befindet sich im Gegensatz zu den Positionen der Zuckermoleküle sowie des AMP-PNP mehr zu L3 und den Aminosäuren Gly103 und Asp104 orientiert. Diese scheinen dabei nicht mehr in dem vermuteten Antibiotikatransportweg zu liegen, da ihre Austausche keine Auswirkung auf den Zuckertransport haben (Abb. 3.15).

Die hier gezeigten Zitratmoleküle befinden sich in einer zum AMP-PNP sehr ähnlichen Lage und werden durch positiv geladene Arginin- und Lysin-Seitenketten koordiniert.

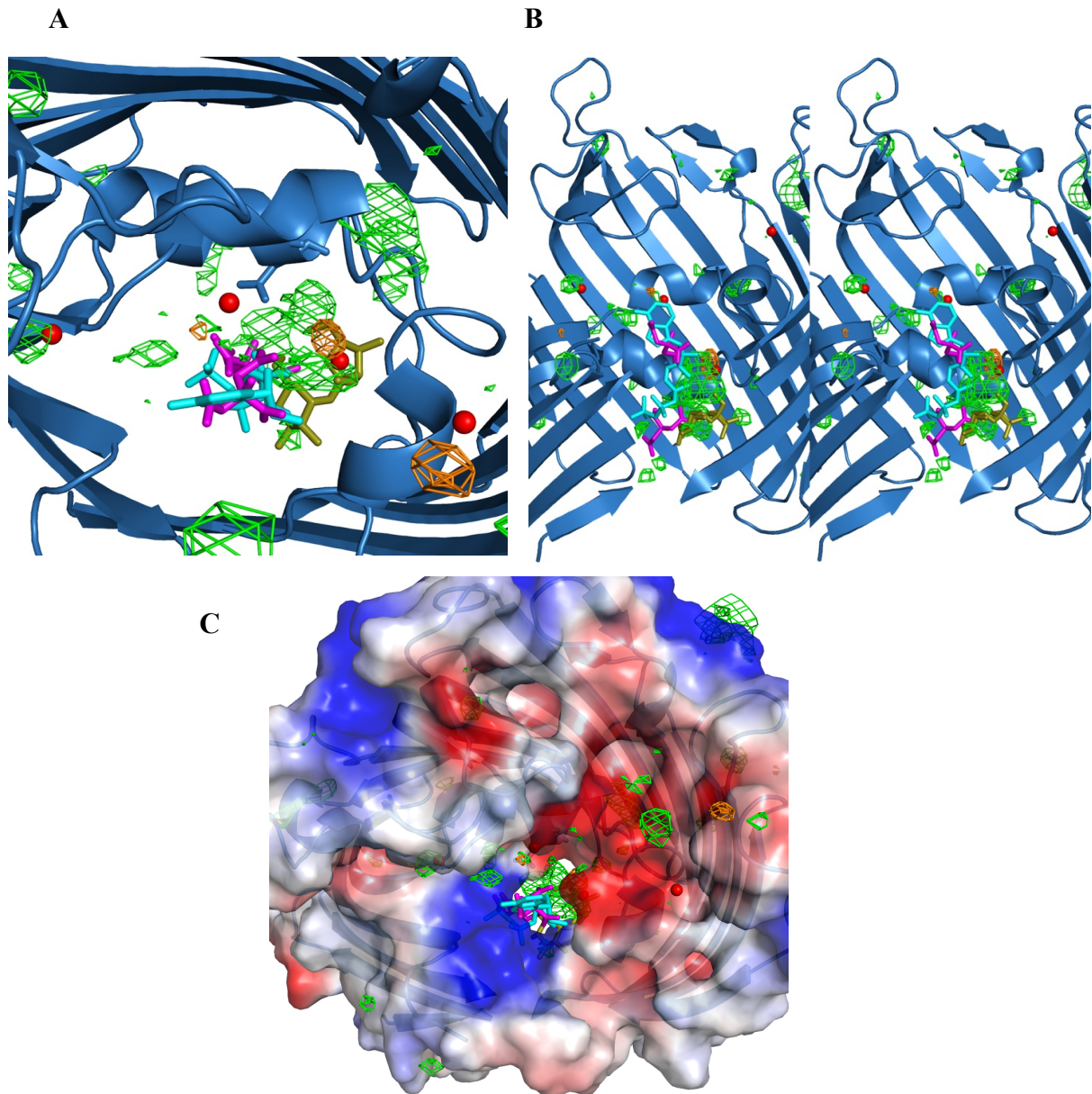


Abb. 4.5: PorB mit komplexierten Liganden. Die Struktur von PorB_{W135} (*cartoon*-Darstellung in blau) ist von der (A) extrazellulären Seite und (B) Membranseite in Stereodarstellung mit komplexierter Saccharose in cyan (3A2S, Tanabe *et al.*, 2010), AMP-PNP in gelbgrün (3VZU, Tanabe *et al.*, 2010) und den Cäsiumkationen (rote Kugeln), Zitratmolekülen (magenta) und der Elektronendichte nach Ampicillin-*soaking* (FoFc, +3 σ , grünes Gitter; Differenzelektronendichte, 5 σ , orangenes Gitter) gezeigt. (C) Die elektrostatische Oberfläche von PorB_{W135} ist mit dem *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS, Baker *et al.*, 2001) berechnet und von der extrazellulären Seite mit den komplexierten Liganden und der Differenzelektronendichtekarte gezeigt. Bereiche mit positivem Potential sind blau, Bereiche mit negativem Potential rot dargestellt und von -20kT/e bis +20kT/e konturiert.

4.5 Interaktionsmechanismus zwischen PorB und TLR2

Die Strukturaufklärung von PorB_{W135} lies Vermutungen zu, dass die Bindung zwischen PorB und TLR2 über elektrostatische Wechselwirkungen der positiv geladenen Aminosäuren in den PorB *loop*-Regionen und den negativ geladenen Seitenketten auf der exponierten TLR2-Oberfläche erfolgen könnten (Tanabe *et al.*, 2010) (Abb. 4.6).

Die hier verglichenen Kristallstrukturen von PorB_B und PorB_{AKR} (Abb. 3.21) zeigten *loop*-Konformationsänderungen. Durchgeführte moleküldynamische Analysen sowie computergestützte Konformationssimulationen ließen vermuten, dass die in PorB_{AKR} vorliegende Konformationsänderung des L7 nicht das Resultat der vorliegenden Kristallanordnung sowie die Auswirkung der Mutation in L7 ist. Strukturelle Unterschiede konnten dabei im Bereich von L7 festgestellt werden, wobei die Konformation dieses *loops* zwischen der PorB_B- und PorB_{AKR}-Struktur stark abwich (Abb. 3.19A, 3.21). Während L7 in PorB_B mehr zur extrazellulären Seite zeigte, war dieser *loop* in der PorB_{AKR}-Struktur in den Kanal orientiert (RMSD-Wert: 4,41 Å) (Abb. 3.21F). Aufgrund dieser inneren Ausrichtung hat L7 eine geringere Exposition zur extrazellulären Seite und somit zum potentiellen Bindungsbereich des TLR2, mit möglichen Auswirkungen auf die TLR2-Bindung.

Zwei weitere PorB_B-Mutanten (PorB_{GEG} und PorB_{L147P}) zeigten im Vergleich zum Wildtyp (PorB_B) ebenfalls differierende Aktivitäten in der Auslösung der Immunantwort (Abb. 1.10). Mit durchgeführten Struktursimulationen (Abb. 3.22C) sollten die Auswirkungen dieser Mutationen innerhalb der betreffenden *loops* im Hinblick auf mögliche Konformationsänderungen analysiert und mit PorB_{AKR} und PorB_B verglichen werden. L5 in PorB_{GEG} (dabei sind die Reste Gly, Glu, Gly zwischen H181 und H182 in L5 eingefügt) wies ebenfalls eine innere Kanalorientierung auf, wobei diese Mutante nach PorB_{AKR} die zweitgrößte Reduzierung der TLR2-abhängigen Zellaktivierung zeigte (Toussi *et al.*, 2012b). Interessanterweise offenbarte die PorB_{L147P}-Mutation in L4 (Abb. 3.22C) auch eine *loop*-Krümmung mit der Tendenz einer inneren Kanalorientierung, wobei diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp (PorB_B) nur eine geringfügig schwächere Auswirkung auf die TLR2-abhängige Zellaktivierung hatte (Abb. 1.10). Möglicherweise ist L5 somit zu weit von einem potentiellen TLR2-PorB-Bindungsbereich entfernt, mit einem geringeren Einfluss auf die Interaktion. Dies lässt den Schluss zu, dass die TLR2-Bindung und die TLR2-abhängige Zellaktivierung durch Konformationsänderungen der extrazellulären *loop*-Bereiche sowie einer verminderten Reduzierung der gesamten oberflächenexponierten Fläche beeinflusst werden könnte, wobei L7 wesentlich an der TLR2-Bindung beteiligt wäre.

Neben Unterschieden in der Struktur wirkte sich die AKR-Mutation auch auf die elektrostatische Oberfläche in PorB_{AKR} aus (Abb. 4.6D, E). Es zeigte sich, dass die Mutation die Nettoladung der oberflächenexponierten *loops* von -3 (PorB_B) zu +2 (PorB_{AKR}) veränderte. Eine positive Nettoladung der extrazellulären *loop*-Regionen konnte ebenfalls für PorB_{W135} gesehen werden (Abb. 3.23), welche eine zum PorB_{AKR} vergleichbare Zellaktivität aufweist (persönliche Mitteilung Paola Massari). Dabei ist die L7-Struktur von PorB_{W135} ähnlicher zu PorB_B (RMSD 1,9 Å) als zu PorB_{AKR} (RMSD 3,9 Å), was auf einen wichtigeren Einfluss der bestehenden *loop*-Oberflächenladung gegenüber der bestehenden *loop*-Konformation hinzuweisen scheint. Auch die Nettoladung von L7 ist durch die Mutation signifikant verändert, wobei sie in PorB_B -3 und PorB_{AKR} sowie PorB_{W135} +2 beträgt. Somit scheint es, dass die elektrostatische Oberfläche der *loops* und zumindest die des L7 wesentlichen Einfluss auf die TLR2-Bindung hat, welche auf elektrostatischen Wechselwirkungen zu beruhen scheint.

Der Komplex zwischen TLR1 und TLR2 bildet einen positiv geladenen Bereich, welcher sich zwischen beiden Rezeptoren auf der konvexen Seite der Hufeisenform befindet (Abb. 4.6A-C). Der konvexe Bereich wurde dabei innerhalb der Toll-*like* Rezeptorfamilie bspw. der Heterodimere TLR1/TLR2 (Jin *et al.*, 2007) und TLR2/TLR4 (Kang *et al.*, 2009) bereits als Interaktionsbereich für Liganden identifiziert und könnte bei der Bindung von PorB ebenfalls die entscheidende Umgebung sein. In diesem Zusammenhang könnte möglicherweise ein exponierter, positiv geladener Bereich zwischen den beiden Rezeptoren TLR1 und TLR2, eine Wechselwirkung mit dem negativ geladenen und exponierten Bereich des L7 vom PorB_B eingehen, wobei diese Umgebung in PorB_{AKR} neutral vorliegt (PorB_{AKR} zeigt im Vergleich zu PorB_B eine um 63% verringerte Immunaktivität).

Darüber hinaus muss zusätzlich erwähnt werden, dass die analysierten strukturellen und elektrostatischen Unterschiede nicht nur Auswirkungen auf eine potentielle direkte TLR2-Bindung, sondern auch Auswirkungen auf eine mögliche Anziehung und Bindung von TLR1 oder einer TLR1-TLR2-Heterodimerisierung haben könnten und eventuell der Grund für die unterschiedliche Aktivierung der Immunantwort sind (Abb. 1.10).

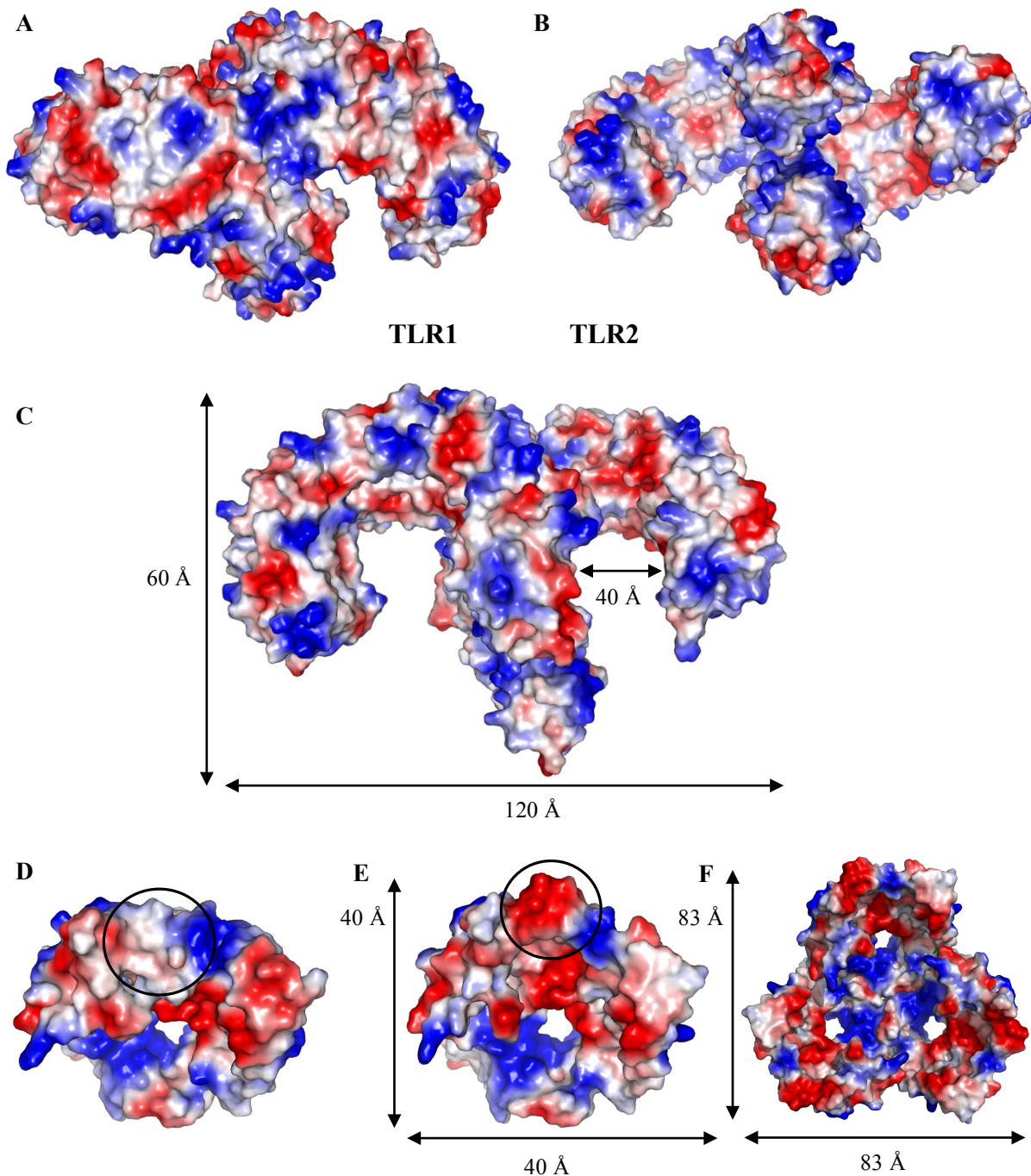


Abb. 4.6: TLR1-TLR2-Komplex. Die Oberflächenpotentiale der extrazellulären Domänen der humanen TLR1 und TLR2 (2Z7X, Jin *et al.*, 2007) sind von der (A) extrazellulären Seite, (B) intrazellulären Seite und (C) Membranseite gezeigt. Die Oberflächenpotentiale von (D) PorB_{AKR} und PorB_B als (E) Monomer bzw. (F) Trimer sind jeweils von der extrazellulären Seite mit markierter L7-Position (Kreis) dargestellt. Die Dimensionen des TLR1/TLR2-Komplexes und des PorB_B sind angegeben. Die Berechnung der Potentiale sind mit APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*, Baker *et al.*, 2011) berechnet. Bereiche mit positivem Potential sind blau, Bereiche mit negativem Potential rot dargestellt und von -20kT/e bis $+20\text{kT/e}$ konturiert. TLR1/TLR2 bilden zusammen einen ausgeprägten, positiv geladenen Bereich auf der konvexen Seite, welcher sich genau zwischen den beiden Rezeptoren befindet und möglicherweise eine Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Bereich von L7 in PorB_B eingeht.

Die direkten *in vitro*-Interaktionsstudien zwischen PorB_B und sTLR2 (Abb. 3.33-3.35) konnten Hinweise auf eine Bindung, aber keine konkreten Bindungsparameter geben. Dabei zeigten die *pull-down*-Assays und SEC-Studien eine scheinbare Bindung zwischen beiden Interaktionspartnern und das sowohl, wenn der sTLR2 als sTLR2Fc-Fusion oder im MBP_sTLR2_GFP-Fusionsprotein vorlag (Abb. 3.34-3.36). Obwohl sTLR2 im MBP_sTLR2_GFP an seinen beiden Enden jeweils von ~25 kDa (GFP) und ~40 kDa (MBP) großen Proteinen flankiert wird, scheint dies keinen Einfluss auf die an einer PorB-TLR2-Interaktion beteiligten Bereiche zu haben. Somit kann vermutet werden, dass die Bindung von PorB nicht an den beiden Enden von TLR2, sondern eher zentral an der konkaven oder konvexen TLR2-Hufeisenform erfolgt, wobei man nicht ausschließen kann, dass die dreidimensionale TLR2-Struktur durch beide Fusionen modifiziert wurde. Dieses Bindungsmuster wäre mit bereits bekannten Ligandkomplexen der humanen Toll-like Rezeptoren (Liu *et al.*, 2008a; Kim *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009) und dem homologen Toll-Rezeptor aus *Drosophila melanogaster* (Lewis *et al.*, 2013) vergleichbar.

ITC-Experimente sollten Hinweise auf Bindungsparameter wie Stöchiometrie, freigesetzte/aufgenommene Energie oder Bindungsstärke geben (A.10). Trotz Variation der Bedingungen konnten mit dieser Methode keine Hinweise auf eine erfolgte Bindung erhalten werden. Möglicherweise könnte das Vorhandensein von Detergens während der Durchführung der ITC-Experimente als möglicher Störfaktor angesehen werden, wobei potentielle Interaktionsbereiche von PorB und sTLR2 durch das Detergens abgeschirmt sein könnten. Dabei sind keine thermodynamischen Parameter von ITC-Messungen in der Literatur beschrieben, die Bindungen von TLRs und Porinen charakterisieren.

Die Interaktion zwischen PorB_{men} und dem humanen sTLR2Fc konnte über indirekte Methoden wie ELISA und Durchflusszytometrie sowie direkt durch Co-Immunpräzipitation analysiert werden. Die Daten ließen auf eine Bindung mit einem K_D-Wert von ~10 nM (mit immobilisiertem PorB) bzw. ~5 nM (mit löslichem PorB) schließen, wobei die Bindung eines PorB-Trimers an ein TLR2-Monomer diskutiert wurde (Massari *et al.*, 2006).

Ähnlich durchgeführte Interaktionsstudien mit sTLR2Fc und PorB_{lac} zeigten wiederum, dass möglicherweise ein unterschiedliches Bindungsmuster zwischen PorB_{men} bzw. PorB_{lac} mit TLR2 existiert (Liu *et al.*, 2010). Die Bindung von PorB_{lac} und sTLR2Fc konnte mit einem K_D-Wert von ~20 nM (mit löslichem PorB) gemessen werden (PorB_{men} ~5 nM). Dabei muss erwähnt werden, dass Werte im Bereich von 5-20 nM keine signifikanten Affinitätsunterschiede repräsentieren.

Die Interaktion von TLR2 mit PorB_{men} und PorB_{lac} induzierte in diesem Zusammenhang unterschiedlich starke Immunantworten in der Expression von z.B. IL-8 (Toussi *et al.*, 2012b) und korreliert mit klinischen Krankheitsberichten (Carrol *et al.*, 2005; Moller *et al.*, 2005). Die Vermutung liegt nahe, dass einzelne spezifische Aminosäuren innerhalb der oberflächenexponierten *loop*-Bereiche einen signifikanten Einfluss auf die TLR2-Bindung und somit auf die Auslösung der Immunantwort kodieren. Natürlich vorkommende PorB-Mutanten mit spezifischen Aminosäureaustauschen, welche unterschiedlich starke Immunreaktionen hervorruften, scheinen dies zu bestätigen (Law *et al.*, 2004; Urwin *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009).

Da ausgebildete Wechselwirkungen in einer *in vitro*-Interaktion zwischen PorB und TLR2 von der Salzkonzentration abhängen (Tanabe *et al.*, 2010), scheinen geladene Aminosäurereste eine wichtige Rolle in dieser Bindung zu spielen. Die hier gezeigten Ergebnisse untermauern diese Vermutung, wobei strukturelle Einflüsse, vor allem von L7 in PorB, ebenfalls an der TLR2-Bindung beteiligt sein könnten und die relativ schwache Aktivität der TLR2-abhängigen Immunantwort der L5- (PorB_{GEG}) und L4-Mutanten (PorB_{L147P}) erklären könnten (Toussi *et al.*, 2012b).

Obwohl hauptsächlich positiv geladene Aminosäurereste innerhalb der *loop*-Regionen an der Bindung ursprünglich vermutet wurden, zeigen die hier präsentierten Ergebnisse ebenfalls einen Einfluss von negativ geladenen Seitenketten, vor allem innerhalb von L7, die somit auch eine wichtige Funktion in der TLR2-Bindung spielen könnten.

Die hier gezeigten Ergebnisse der Interaktion zwischen PorB_B und dem sTLR2 konnten zwar nur Hinweise auf eine *in vitro*-Komplexierung beider Interaktionspartner geben, könnten dennoch eine vielversprechende Grundlage zukünftiger Kristallisationsversuche des PorB-TLR2-Komplexes sein.

4.6 Die Rolle weiterer Porine

Neben den beiden neisserialen Porinen PorB_{W135} und PorB_B konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere bekannte TLR2-Liganden OmpP2 aus *H. influenzae* und FomA aus *F. nucleatum* erfolgreich exprimiert, renaturiert und gereinigt werden (Abb. 3.2, 3.4). Ihre thermodynamischen Parameter, welche durch chemische- sowie thermische Denaturierungsübergänge analysiert wurden, wiesen auf eine hohe Stabilität hin und waren in ihren Werten in etwa zu den Porinen aus N_{men} vergleichbar (Tab. 3.1). Ihre native Funktion

konnte durch die Analyse des Zuckertransportes nach erfolgreicher Rekonstitution in Proteoliposomen bestätigt werden (Abb. 3.13, 3.14), wobei diese Analyse im Vergleich zu den beiden Porinen PorB_{W135} (Tanabe *et al.*, 2010) und PorB_B (Abb. 3.24) erfolgte. Während in PorB_{men} eine starke Differenzierung im Transport von Einfach- und Zweifachzuckern gesehen wurde (Tanabe *et al.*, 2010; Abb. 3.36), konnte dies in OmpP2 (Abb. 3.38) sowie FomA (Abb. 3.40) nicht bestätigt werden. In den beiden letztgenannten Porinen wurden Einfach- und Zweifachzucker mit einer nahezu gleichen Transporteffizienz durch den Kanal befördert, während der Transport von Zweifachzuckern in PorB_{men} nur geringfügig erfolgte. Ein Transport des Dreifachzuckers Raffinose (505 Da) fand in PorB_B kaum statt, während er in OmpP2 etwa die Hälfte der Transporteffizienz der Einfach- und Zweifachzucker einnahm. Raffinose wurde in FomA interessanterweise mit einer nahezu gleichen Geschwindigkeit wie die der Einfach- und Zweifachzucker transportiert. Der Vierfachzucker Stachyose (667 Da) wurde bedingt durch die molekulare Ausschlussgröße (600 Da) in PorB_{men} nicht mehr transportiert, während er in OmpP2 etwa ein Fünftel und in FomA etwa die Hälfte der Transporteffizienz von Einfachzuckern hatte. Dextran T-3 (etwa 3000 Da) wurde in allen getesteten Porinen nicht transportiert. Diese ausgeprägten Unterschiede in der Transporteffizienz von Zuckern im Molekulargewichtsbereich von 180-667 Da, weisen auf strukturelle Unterschiede innerhalb der Konstriktionszonen der analysierten Porine hin. Während der Kanaldurchmesser in PorB_{men} einen Transport von Zuckern über 180 Da nur geringfügig erlaubte, scheint die Porengröße in OmpP2 und noch mehr in FomA im Durchmesser anzusteigen, wodurch Moleküle mit etwa 340 Da (in OmpP2) sowie etwa 505 Da (in FomA) möglicherweise nur schwache Interaktionen mit Seitenketten im Porinkanal eingehen und durch den Kanal diffundieren. Anhand dieser Daten kann spekuliert werden, dass der Kanaldurchmesser von OmpP2 und noch mehr von FomA im Vergleich zu einem Durchmesser von jeweils $8 \times 10 \text{ \AA}$ in PorB_{men} sowie PorB_{gon} (Abb. 3.19A) deutlich größer zu sein scheint. Eine im Vergleich zu PorB höhere molekulare Ausschlussgröße von 1400 Da (anstatt 600 Da), welche für das OmpP2 diskutiert wurde (Vachon *et al.*, 1990), scheint die hier gezeigten Ergebnisse (Abb. 3.38) zu bestätigen.

Ein Vergleich mit anderen bakteriellen Membranporinen bezüglich der molekularen Ausschlussgröße kann aufgrund von zu wenigen experimentellen Daten nur schwer erfolgen. Lediglich eine Ausschlussgröße von 600 Da für die wenig spezifischen, passiven 16- β -Faltblatt-Membranporine aus *E. coli* (OmpF, OmpC) scheint gesichert zu sein (McPhee *et al.*, 2009). Die hier gezeigten Daten lassen den Schluss zu, dass bei den untersuchten Porinen

(PorB, OmpP2, und FomA) wahrscheinlich keine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der Faltblattstränge und der molekularen Ausschlussgröße herrscht.

Die Auswahl der beiden Porine OmpP2 und FomA bezüglich ihrer funktionellen und strukturellen Charakterisierung erfolgte insbesondere aufgrund ihrer bekannten TLR2-Komplexierung (Galdiero *et al.*, 2004; Toussi *et al.*, 2012a), könnte aber auch die hier aufgestellte Hypothese eines vergrößerten Kanaldurchmesser im Vergleich zu PorB bestätigen. Die Aufklärung ihrer Struktur würde ein komplettes Bild ihrer Funktion sowie eine Interpretation der TLR2-Interaktion ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mithilfe von Kristallstrukturen in zwei unterschiedlichen Raumgruppen sowie mit Simulationen der Moleküldynamiken die separate und simultane Translokation von Anionen und Cäsiumkationen in dem Porin PorB_{W135} identifiziert und näher charakterisiert werden. Dabei wurden die Positionen von vier Cäsiumkationen innerhalb der Kristallstruktur sowie spezifische Kationenbindestellen im Kanal identifiziert. Zusätzlich wurde die Genauigkeit sowie Auflösung (von 2,2 Å auf 1,8 Å) der dreidimensionalen Kristallstruktur von PorB_{W135} durch Kristalloptimierung verbessert.

Des Weiteren konnte die dreidimensionale Struktur der PorB-Serogruppe (Serogruppe B) und AKR-Variante (PorB_{AKR}) aufgeklärt werden. Diese L7-loop-Variante, welche im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant geringere TLR2-abhängige Immunantwort induzierte, konnte Hinweise auf den PorB-TLR2-Bindungsmechanismus geben. Dabei tragen sowohl negative als auch positive elektrostatische Kräfte, welche an den oberflächenexponierten *loops* im Porin lokalisiert sind, wesentlich zur TLR2-Bindung bei. Die extrazelluläre Domäne des TLR2 konnte in ausreichenden Mengen als Fusionsprotein mit MBP und GFP rekombinant in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert und gereinigt werden, wobei *in vitro*- Interaktionsstudien Hinweise einer Bindung mit PorB_B zeigten. Dies könnte somit die Grundlage zukünftiger Kristallisationsversuche des PorB-TLR2-Komplexes darstellen.

Mit Untersuchungen des Antibiotikatransportes in PorB_{W135}-Mutanten, die im Vergleich zum Wildtyp einen um etwa 50% verringerten Transport aufwiesen, konnte eine Schlüsselposition in der Antibiotikatranslokation identifiziert werden, welche sich an Position 103 im *loop 3* (L3) befindet. Diese Position könnte den Antibiotikafluss sowohl durch sterische Effekte, als auch durch elektrostatische Einflüsse beeinflussen. Zusätzlich konnte eine neue Elektronendichte in der PorB_{W135}-Struktur nach *soaking*-Experimenten mit Antibiotika identifiziert werden, wobei komplexiertes Ampicillin nicht vollständig bestätigt werden konnte.

Darüber hinaus wurden mit OmpP2 aus *Haemophilus influenzae* und FomA aus *Fusobacterium nucleatum* zwei weitere Porine untersucht, die jeweils die größte Gruppe von Proteinen in der äußeren Membran ihrer jeweiligen Bakteriengattung repräsentieren. Dabei gaben Durchflusseexperimente Hinweise auf das Vorliegen unterschiedlicher Strukturgeometrien innerhalb dieser Porin-Kanäle.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Hinweise zum Mechanismus der PorB-TLR2-Bindung erlangt werden, wobei der Komplex bzw. die Interaktion auf molekularer Ebene nur durch eine dreidimensionale Kristallstruktur vollständig erklärt werden kann.

In diesem Zusammenhang war es hier möglich, die extrazelluläre TLR2-Rezeptordomäne (sTLR2) mittels rekombinanter Expression in der Hefe *S. cerevisiae* im Hinblick auf zukünftige röntgenkristallographische Untersuchungen zu gewinnen. Dabei konnten Hinweise einer direkten Bindung zwischen den gereinigten Proteinen PorB_B und sTLR2 *in vitro* erhalten werden, welche als Grundlage für eine Strukturaufklärung des Komplexes angesehen werden können.

Neben der strukturellen Untersuchung sind biophysikalische Analysen der Interaktion ebenfalls dringend erforderlich. Die Bindungsparameter, welche die Interaktion zwischen dem Porin und dem TLR2 näher charakterisieren würden, könnten mit den hier rekombinant exprimierten Proteinen in direkten (z.B. Co-Immunopräzipitation, analytische Ultrazentrifugation, Oberflächenplasmonresonanz), aber auch in indirekten Methoden (ELISA, Fluoreszenz-Korrelation-Spektroskopie) erfolgen, wobei auch die bereits als Liganden identifizierten FomA- und OmpP2-Porine in diese Untersuchungen einbezogen werden sollten. Der Vergleich dieser verschiedenen Porine könnte eventuell Unterschiede in der TLR2-Bindung aufzeigen, die wiederum wichtige Hinweise auf die Bindungsmodalität, aber auch den Ablauf von Wechselwirkungen geben könnten. Eine bereits erfolgte Analyse der Interaktion zwischen PorB und sTLR2 mittels Kryo-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen konnte zwar keine aussagekräftigen Hinweise liefern, könnte aber durch einen Wechsel der Pufferbedingungen oder der Probenpräparation dennoch eine wichtige Methode zur Charakterisierung des Komplexes werden. Im Zusammenhang mit dem Antibiotikatransport in PorB könnten MD-Simulationen die hier identifizierte Elektronendichte nahe L3 als Ampicillin-Molekül bestätigen, wobei durch die Erstellung von dreidimensionalen PMF-Karten bevorzugte Antibiotikabindestellen gefunden und so der gesamte Translokationsweg näher beschrieben werden könnte. Leitfähigkeitsmessungen könnten die Ergebnisse des hier gezeigten Schwellungsassays in PorB_{W135} unterstützen, wobei sie auch Hinweise auf die Translokation von Ionen bei gleichzeitiger Antibiotikapräsenz geben könnten.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, P.D, Afonine, P.V, Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echao, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., and Zwart, P.H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst. D* 66, 213-221.
- Andersen, C., Maier, E., Kemmer, G., Blass, J., Hilpert, A.K., and Benz, R. (2003). Porin OmpP2 of *Haemophilus influenzae* shows specificity for nicotinamide-derived nucleotide substrates. *J. Bio. Chem.* 278, 24269-24276.
- Atkinson, W., Hamborsky, J., McIntyre, L., and Wolfe, S. (2006). Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases (9th ed.). Washington, D.C.: Public Health Foundation.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., and McCammon, J.A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10037-10041.
- Bakken, V., Aaro, S., and Jensen, H.B. (1989). Purification and partial characterization of a major outer-membrane protein of *Fusobacterium nucleatum*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 3253–3262.
- Balasubramaniam, D., Arockiasamy, A., Kumar, P.D., Sharma, A., and Krishnaswamy, S. (2012). Asymmetric pore occupancy in crystal structure of OmpF porin from *Salmonella typhi*. *J. Struct. Biol.* 178, 233–244.
- Bar-On, E.S., Goldberg, E., Hellmann, S., and Leibovici, L. (2012). Combined DTP-HBV-HIB vaccine versus separately administered DTP-HBV and HIB vaccines for primary prevention of diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and *Haemophilus influenzae* B (HIB). *Cochrane Database Syst. Rev.* 18, 4.
- Bell, J., Grass, S., Jeanteur, D., and Munson, R.S. Jr. (1994). Diversity of the P2 protein among nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. *Infect. Immun.* 62, 2639-2643.
- Bernardi, P., and Petronilli, V. (1996). The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 131-138.
- Blake, M.S. and Gotschlich, E.C. (1987). Bacterial outer membranes as model systems. In Inouye, M. (ed.), John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 377–400.
- Bolstad, A., Jensen, H., and Bakken, V. (1996). Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin. Microbio. Rev.* 9, 55-71.

- Bolstad, A.I., Tommassen, J., and Jensen, H.B. (1994). Sequence variability of the 40-kDa outer membrane proteins of *Fusobacterium nucleatum* strains and a model for the topology of the proteins. *Mol. Gen. Genet.* 244, 104–110.
- Braun, V., and Braun, M. (2002). Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 529, 78-85.
- Braun, V. (2009). FhuA (TonA), the career of a protein. *J Bacteriol.* 191, 3431-3436.
- Bredin, J., Saint, N., Malléa, M., Dé, E., Molle, G., Pagès, J.M., and Simonet, V. (2002). Alteration of pore properties of *Escherichia coli* OmpF induced by mutation of key residues in anti-loop 3 region. *Biochem. J.* 363, 521–528.
- Bredin, J., Simonet, V., Iyer, R., Delcour, A.H., and Pagès, J.M. (2003). Colicins, spermine and cephalosporins: a competitive interaction with the OmpF eyelet. *Biochem. J.* 376, 245–252.
- Buchanan, S.K. Smith, B.S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D., and Deisenhofer J. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* 6, 56-63.
- Burke, J.M., Ganley-Leal, L.M., Khatri, A., and Wetzler, L.M. (2007). *Neisseria meningitidis* PorB, a TLR2 ligand, induces an antigen-specific eosinophil recall response: potential adjuvant for helminth vaccines? *J. Immunol.* 179, 3222-3230.
- Cabeen, M.T., and Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 601-610.
- Carrol, E.D., Thomson, A.P., Jones, A.P., Jeffers, G., and Hart, C.A. (2005). A predominantly anti-inflammatory cytokine profile is associated with disease severity in meningococcal sepsis. *Intensive Care Med.* 31, 1415–1419.
- Chevalier, J., Pagès, J.M., and Mallea, M. (1999). In vivo modification of porin activity conferring antibiotic resistance to *Enterobacter aerogenes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 248–251.
- Chiavolini, D., Weir, S., Murphy, J.R., and Wetzler, L.M. (2008). *Neisseria meningitidis* PorB, a Toll-like receptor 2 ligand, improves the capacity of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to protect mice against experimental tularemia. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 1322-1329.
- Choudhary, O.P., Paz, A., Adelman, J.L., Colletier, J.P., Abramson, J., and Grabe, M. (2014). Structure-guided simulations illuminate the mechanism of ATP transport through VDAC1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 626-632.

- Colombini, M., Blachly-Dyson, E., and Forte, M. (1996). VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels* 4, 169–202.
- Colombini, M. (2004). VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol. Cell. Biochem.* 256, 107–115.
- Cryns, V.L., Bergeron, L., Zhu, H., Li, H. and Yuan, J. (1996). Specific cleavage of alpha-fodrin during fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/ CED-3 protease distinct from the poly (ADP-ribose) polymerase protease. *J. Biol. Chem.* 271, 31277–31282.
- Danelon, C., Nestorovich, E.M., Winterhalter, M., Ceccarelli, M., and Bezrukov, S.M. (2006). Interaction of zwitterionic penicillins with the OmpF channel facilitates their translocation. *Biophys. J.* 90, 1617–1627.
- Dé, E., Baslé, A., Jaquinod, M., Saint, N., Mallaé, A., Molle, G., and Pagès, J.M. (2001). A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. *Mol. Microbiol.* 41, 189-198.
- Delcour, A.H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 808–816.
- Dhakshnamoorthy, B., Raychaudhury, S., Blachowicz, L., and Roux B. (2010). Cation-selective pathway of OmpF porin revealed by anomalous X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* 396, 293–300.
- Dhakshnamoorthy, D., Ziervogel, B., Blachowicz, L., and Roux, B. (2013). A Structural Study of Ion Permeation in OmpF Porin from Anomalous X-ray Diffraction and Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 16561-16568.
- Drew, D., Slotboom, D.J., Friso, G., Reda, T., Genevaux, P., Rapp, M., Meindl-Beinker, N.M., Lambert, W., Lerch, M., Daley, D.O., Van Wijk, K.J., Hirst, J., Kunji, E., and De Gier, J.W. (2005). A scalable, GFP-based pipeline for membrane protein overexpression screening and purification. *Protein Sci.* 14, 2011-2017.
- Drew, D., Newstead, S., Sonoda, Y., Kim, H., Von Heijne, G., and Iwata S. (2008). GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Protoc.* 3, 784-798.
- Duim, B., Vogel, L., Puijk, W., Jansen, H.M., Meloen, R.H., Dankert, J., and van Alphen, L. (1996). Fine mapping of outer membrane protein P2 antigenic sites which vary during persistent infection by *Haemophilus influenzae*. *Infecti. Immun.* 64, 4673-4679.

- Dutzler, R., Wang, Y.F., Rizkallah, P., Rosenbusch, J.P., and Schirmer, T. (1996). Crystal structures of various maltooligosaccharides bound to maltoporin reveal a specific sugar translocation pathway. *Structure* 15, 127-134.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst. D* 60, 2126-2132.
- Estabrook, M.M., Jack, D.L., Klein, N.J., and Jarvis, G.A. (2004). Mannose-binding lectin binds to two major outer membrane proteins, opacity protein and porin, of *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol.* 172, 3784–3792.
- Ferguson, A.D., Chakraborty, R., Smith, B.S., Esser, L., van der Helm, D., and Deisenhofer, J. (2002). Structural basis of *gating* by the outer membrane transporter FecA. *Science* 295, 1715-1719.
- Finne, J., Leinonen, M., and Makela, P.H. (1983). Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 2, 355–357.
- Follows, S.A., Murlidharan, J., Massari, P., Wetzler, L.M., and Genco, C.A. (2009). *Neisseria gonorrhoeae* infection protects human endocervical epithelial cells from apoptosis via expression of host antiapoptotic proteins. *Infect. Immun.* 77, 3602–3610.
- Forst, D., Welte, W., Wacker, T. and Diederichs, K. (1998). Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat. Struct. Biol.* 5, 37-46.
- Fusco, P.C., Michon, F., Laude-Sharp, M., Minetti, C.A., Huang, C.H., Heron, I., and Blake, M.S. (1998) Preclinical studies on a recombinant group B meningococcal porin as a carrier for a novel *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Vaccine* 16, 1842–1849.
- Galdiero, M., D'Amico, M., Gorga, F., Di Filippo, C., D'Isanto, M., Vitiello, M., Longanella, A., and Tortora, A. (2001). *Haemophilus influenzae* Porin Contributes to Signaling of the Inflammatory Cascade in Rat Brain. *Infect. Immun.* 69, 221-227.
- Galdiero, S., Capasso, D., Vitiello, M., D'Isanto, M., Pedone, C., and Galdiero, M. (2003). Role of surface-exposed loops of *Haemophilus influenzae* protein P2 in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Infect. Immun.* 71, 2798-2809.
- Galdiero, M., Galdiero, M., Finamore, E., Rossano, F., Gambuzza, F., Catania, M.R., Teti, G., Midiri, A., and Mancuso, G. (2004). *Haemophilus influenzae* porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. *Infect. Immun.* 72, 1204-1209.

- Galdiero, S., Vitiello, M., Amodeo, P., D'Isanto, M., Cantisani, M., Pedone, C., and Galdiero, M. (2006). Structural requirements for proinflammatory activity of porin P2 Loop 7 from *Haemophilus influenzae*. *Biochemistry* 45, 4491-4501.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., and Wilkins, M.R. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, pp. 571- 607.
- Gill, M. J., Simjee, S., Al-Hattawi, K., Robertson, B.D., Easmon, C.S., and Ison, C.A. (1998). Gonococcal resistance to β -lactams and tetracycline involves mutation in loop 3 of the porin encoded at the penB locus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2799–2803.
- Gram, H.C. (1884). Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschr. Med.* 2, 185-189.
- Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Griko, Y.V., Privalov, P.L., Venyaminov, S.Y., and Kutysenko, V.P. (1988). Thermodynamic study of the apomyoglobin structure. *J. Mol. Biol.* 202, 127-138.
- Härle, C., Kim, I., Angerer, A., and Braun, V. (1995). Signal transfer through three compartments: Transcription initiation of the *Escherichia coli* ferric citrate transport system from the cell surface. *EMBO J.* 14, 1430–1438.
- Han, Y.W., Redline, R.W., Li, M., Yin, L., Hill, G.B., and McCormick, T.S. (2004). *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infect. Immun.* 72, 2272-2279.
- Han, Y.W., Fardini, Y., Chen, C., Iacampo, K.G., Peraino, V.A., Sharmonki, J.M., and Redline, R.W. (2010). Term stillbirth caused by oral *Fusobacterium nucleatum*. *Obstet. Gynecol.* 115, 442-445.
- Hjelmeland, L.M., and Chrambach, A. (1984). Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol.* 104, 305-318.
- Hollis, D.G., Wiggins, G.L., and Weaver, R.E. (1969). *Neisseria lactamica* sp. n., a Lactose-fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. *Appl. Microbiol.* 17, 71-77.
- Im, W., and Roux, B. (2002). Ion permeation and selectivity of OmpF porin: A theoretical study based on molecular dynamics, Brownian dynamics, and continuum electrodiffusion theory. *J. Mol. Biol.* 322, 851–869.
- Immirzi, A. (1966). Fast Fourier transform in Crystallography. In *Crystallographic Computing Techniques*, pp. 399-412, edited by F.R. Ahmed, K. Huml, and B. Sedlacek. Copenhagen: Munksgaard and International Union of Crystallography.

- Jadhav, S.R., Zheng, Y., Garavito M.R., and Worden M.R. (2008). Functional characterization of PorB class II porin from *Neisseria meningitidis* using a tethered bilayer lipid membrane. *Biosens. Bioelectron.* 24, 837–841.
- Jadhav, S.R., Rao, K.S., Zheng, Y., Garavito, R.M., and Worden, R.M. (2012). Voltage dependent closure of PorB class II porin from *Neisseria meningitidis* investigated using impedance spectroscopy in a tethered bilayer lipid membrane interface. *J. Colloid Interface Sci.* 390, 211-216.
- Janicke, R.U., Ng, P., Sprengart, M.L., and Porter, A.G. (1998). Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 15540-15545.
- Jarva, H., Ram, S., Vogel, U., Blom, A.M., and Meri, S. (2005). Binding of the complement inhibitor C4bp to serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol.* 174, 6299–6307.
- Jiang, J.H., Davies, J.K., Lithgow, T., Strugnell, R.A., and Gabriel, K. (2011). Targeting of Neisserial PorB to the mitochondrial outer membrane: an insight on the evolution of β -barrel protein assembly machines. *Mol. Microbiol.* 82, 976-987.
- Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.-G., Lee, H., and Lee, J.-O. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130, 1071-82.
- Kang, J.Y., Nan, X., Jin, M.S., Youn, S.J., Ryu, Y.H., Mah, S., Han, S.H., Lee, H., Paik, S.G., and Lee, J.O. (2009). Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 heterodimer. *Immunity* 31, 873-884.
- Kefala, G., Ahn, C., Krupa, M., Esquivies, L., Maslennikov, I., Kwiatkowski, W., and Choe, S. (2010). Structures of the OmpF porin crystallized in the presence of foscholine-12. *Protein Sci.* 19, 1117-1125.
- Kim, H.M., Park, B.S., Kim, J.I., Kim, S.E., Lee, J., Oh, S.C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O.J., and Lee, J.O. (2007). Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran. *Cell* 130, 906-917.
- Kleivdal, H., Benz, R., and Jensen, H. B. (1995). The *Fusobacterium nucleatum* major outer-membrane protein (FomA) forms trimeric, water-filled channels in lipid bilayer membranes. *Eur. J. Biochem.* 233, 310-316.
- Kleivdal, H., Benz, R., Tommassen, J., and Jensen, H.B. (1999). Identification of positively charged residues of FomA porin of *Fusobacterium nucleatum* which are important for pore function. *Eur. J. Biochem.* 260, 818–824.

- Kleivdal, H., Puntervoll, P., and Jensen, H.B. (2001). Topological investigations of the FomA porin from *Fusobacterium nucleatum* and identification of the constriction loop L6. *Microbiology* 147, 1059–1067.
- Koebnik, R., Locher, K.P., and Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* 37, 239-253.
- Korkmaz-Ozkan, F., Köster, S., Kühlbrandt, W., Mäntele, W., and Yildiz, O. (2010). Correlation between the OmpG secondary structure and its pH-dependent alterations monitored by FTIR. *J. Mol. Biol.* 401, 56-67.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914-919
- Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., El-Omar, E.M., Brenner, D., Fuchs, C.S., Mexerson, M., and Garrett, W.S. (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment (2013). *Cell Host Microbe* 14, 207-215.
- Kozjak-Pavlovic, V., Dian-Lothrop, E.A., Meinecke, M., Kepp, O., Ross, K., Rajalingam, K., Harsman, A., Hauf, E., Brinkmann, V., Günther, D., Herrmann, I., Hurwitz, R., Rassow, J., Wagner, R., and Rudel, T. (2009). Bacterial porin disrupts mitochondrial membrane potential and sensitizes host cells to apoptosis. *PLoS Pathog.* 5, e1000629.
- Kumar, A., Hajjar, E., Ruggerone, P., and Ceccarelli, M. (2010). Structural and dynamical properties of the porins OmpF and OmpC: insights from molecular simulations. *J. Phys. Condens. Matter* 22, 454125-454135.
- Kutzner, C., Grubmüller H, de Groot, B.L., and Zachariae, U. (2011). Computational electrophysiology: the molecular dynamics of ion channel permeation and selectivity in atomistic detail. *Biophys. J.* 101, 809–817.
- Kwon, K., Hasseman, J., Latham, S., Grose, C., Do, Y., Fleischmann, R.D., Pieper, R., and Peterson, S.N. (2011). Recombinant expression and functional analysis of proteases from *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, and *Yersinia pestis*. *BMC Biochem.* 12, 17.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007). ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.

- Laskowski, R.A., Macarthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.
- Law, D.K., Henderson, A.M., and Tsang, R.S. (2004). DNA sequence analysis of the PorB protein of nonserotypeable serogroup C ET-15 meningococci suggests a potential mutational hot spot on their serotype antigens. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2718–2723.
- Leavitt, S., and Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 560-566.
- Lee, K.I., Rui, H., Pastor, R.W., and Im, W. (2011). Brownian dynamics simulations of ion transport through the VDAC. *Biophys. J.* 100, 611–619.
- Lewis, M., Arnot, C.J., Beeston, H., McCoy, A., Ashcroft, A.E., Gay, N.J., and Gangloff M. (2013). Zytokine Spatzle binds to the Drosophila immunoreceptor Toll with a neurotrophin-like specificity and couples receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 20461-20466.
- Lian, J., Ding, S., Cai, J., Zhang, D., Xu, Z., and Wang, X. (2009). Improving aquaporin Z expression in Escherichia coli by fusion partners and subsequent condition optimization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 463-470.
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, Y.N., Shiloach, Y.S., Segal, D.M., and Davies, D.R. (2008a). Structural basis of Toll-Like Receptor 3 Signaling with doublestranded RNA. *Science* 320, 379-381.
- Liu, X., Wetzler, L.M., and Massari, P. (2008b). The PorB porin from commensal Neisseria lactamica induces Th1 and Th2 immune responses to ovalbumin in mice and is a potential immune adjuvant. *Vaccine* 26, 786–796.
- Liu, X., Wetzler, L.M., Nascimento, L.O., and Massari P. (2010). Human airway epithelial cell responses to Neisseria lactamica and purified porin via Toll-like receptor 2-dependent signaling. *Infect. Immun.* 78, 5314-5323.
- Livingston, P.O., Claves, M.J., Helling, F., Zollinger, W.D., Blake, M.S., and Lowell, G.H. (1993). GD3/proteosome vaccines induce consistent IgM antibodies against the ganglioside GD3. *Vaccine* 11, 1199–1204.
- Locher, K.P., and Rosenbusch, J.P. (1997). Oligomeric states and siderophore binding of the ligand-gated FhuA protein that forms channels across Escherichia coli outer membranes. *Eur. J. Biochem.* 247, 770-775.

- Locher, K.P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch J.P., and Moras, D. (1998). Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: Crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* 95, 771-778.
- Lou, K.L., Saint, N., Prilipov, A., Rummel, G., Besnon, S.A., Rosenbusch, J.P., and Schirmer, T. (1996). Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. I. Crystallographic analysis. *J. Biol. Chem.* 271, 20669-20675.
- Lynch, E.C., Blake, M.S., Gotschlich, E.C. and Mauro, A. (1984). Studies on porins: spontaneously transferred from whole cells and from proteins of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Biophys. J.* 45, 104–107.
- Lytton, E.J, and Blake, M.S. (1986). Isolation and partial characterization of the reduction-modifiable protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med* 164, 1749–1759.
- Mackinnon, F.G., Ho, Y., Blake, M.S., Michon, F., Chandraker, A., Sayegh, M.H., and Wetzler, L.M. (1999). The role of B/T costimulatory signals in the immunopotentiating activity of neisserial porin. *J. Infect. Dis.* 180, 755–761.
- MacLeod, H., Bhasin, N., and Wetzler, L.M. (2008). Role of protein tyrosine kinase and Erk1/2 activities in the Toll-like receptor 2-induced cellular activation of murine B cells by neisserial porin. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 630–637.
- Makino, S., van Putten, J.P., and Meyer, T.F. (1991). Phase variation of the opacity outer membrane protein controls invasion by *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells. *EMBO J.* 10, 1307–1315.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Rémy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., and Kroemer, G. (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 187, 1261-1271.
- Massari, P., Ho, Y., and Wetzler, L.M. (2000). *Neisseria meningitidis* porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9070-9075.
- Massari, P., Henneke, P., Ho, Y., Latz, E., Golenbock, D.T., and Wetzler, L.M. (2002). Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J. Immunol.* 168, 1533-1537.
- Massari, P., Ram, S., MacLeod, H., and Wetzler, L.M. (2003). The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends Microbiol.* 11, 87-93.

- Massari, P., Visintin, A., Gunawardana, J., Halmen, K.A., Golenbock, D.T., and Wetzler, L.M. (2006). Meningococcal porin PorB binds to TLR2 and requires TLR1 for signaling. *J. Immunol.* 176, 2373–2380.
- Massari, P., Gunawardana, J., Liu, X., and Wetzler, L.M. (2010). Meningococcal porin PorB prevents cellular apoptosis in a toll-like receptor 2- and NF-kappaB-independent manner. *Infect. Immun.* 78, 994-1003.
- McPhee, J.B., Tamber, S., Brazas, M.D., Lewenza, S., and Hancock, R.E. (2009). Antibiotic Resistance Due to Reduced Uptake. D.I. Mayers (ed.). Antimicrobial Drug Resistance. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media LLC 2009.
- Minetti, C.A., Tai, J.Y., Blake, M.S., Pullen, J.K., Liang, S.M., Remeta, D.P. (1997). Structural and functional characterization of a recombinant PorB class 2 protein from *Neisseria meningitidis*. Conformational stability and porin activity. *J. Biol. Chem.* 272, 10710–10720.
- Misra, R., and Benson, S.A. (1988). Isolation and characterization of OmpC porin mutants with altered pore properties. *J. Bacteriol.* 170, 528–533.
- Moller, A.S., Bjerre, A., Brusletto, B., Joo, G.B., Brandtzaeg, P., and Kierulf, P. (2005). Chemokine patterns in meningococcal disease. *J. Infect. Dis.* 191, 768–775.
- Müller, A., Günther, D., Dux, F., Naumann, M., Meyer, T.F., and Rudel, T. (1999). Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *EMBO J.* 18, 339-352.
- Müller, A., Günther, D., Brinkmann, V., Hurwitz, R., Meyer, R., and Rudel, T. (2000). Targeting of the pro-apoptotic VDAC-like porin (PorB) of *Neisseria gonorrhoeae* to mitochondria of infected cells. *EMBO J.* 19, 5332-5343.
- Müller, A., Rassow, J., Grimm, J., Machuy, N., Meyer, T.F., and Rudel, T. (2002). VDAC and the bacterial porin PorB of *Neisseria gonorrhoeae* share mitochondrial import pathways. *EMBO J.* 21, 1916–1929.
- Murphy, T.F., and Bartos, L.C. (1988). Purification and analysis with monoclonal antibodies of P2, the major outer membrane protein of nontypable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 56, 1084-1089.
- Murshudov, G.N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997). Refinement of Macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, 240-255.

- Naveed, H., Jackups, R.Jr., and Liang, J. (2009). Predicting weakly stable regions, oligomerization state, and protein-protein interfaces in transmembrane domains of outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12735-12740.
- Naveed, H., Xu, Y., Jackups, R.Jr., and Liang, J. (2012). Predicting three-dimensional structures of transmembrane domains of β -barrel membrane proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 1775-1781.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M., and Upton, S. J. (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* 28, 239-242.
- Nestorovich, E.M., Danelon, C., Winterhalter, M., and Bezrukov, S.M. (2002). Designed to penetrate: Time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 9789-9794.
- Nestorovich, E.M., Rostovtseva, T.K., Bezrukov, S.M. (2003). Residue ionization and ion transport through OmpF channels. *Biophys. J.* 85, 3718-3729.
- Nikaido, H., Rosenberg, E.Y., and Foulds, J. (1983). Porin channels in Escherichia coli: studies with β -lactams in intact cells. *J. Bacteriol.* 153, 232-240.
- Nikaido, H., and Rosenberg, E.Y. (1983). Porin channels in Escherichia coli: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J. Bact.* 153, 241-252.
- Nikaido, H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* 6, 435-442.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, 593-656.
- Olesky, M., Hobbs, M., and Nicholas R.A. (2002). Identification and analysis of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in Neisseria gonorrhoeae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2811-2820.
- Olesky, M., Zhao, S., Rosenberg, R.L., and Nicholas, R.A. (2006). Porin-mediated antibiotic resistance in Neisseria gonorrhoeae: Ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations. *J. Bacteriol.* 188, 2300-2308.
- Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology, Volume 276: Macromolecular Crystallography, part A*, pp. 307-326, C.W. Carter, Jr. & R.M. Sweet, Eds., Academic Press (New York).
- Pageès, J.M., James, C.E., and Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 893-903.

- Pautsch, A., and Schulz, G.E. (1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat. Struct. Biol.* 5, 1013-1017.
- Pautsch, A., and Schulz, G.E. (2000). High-resolution structure of the OmpA membrane domain. *J. Mol. Biol.* 298, 273-282.
- Pierre, B., Xiong, T., Hayles, L., Guntaka, V.R., and Kim, J.R. (2011). Stability of a guest protein depends on stability of a host protein in insertional fusion. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1011-1020.
- Platt, A., MacLeod, H., Massari, P., Liu, X., and Wetzler, L. (2013). In vivo and in vitro characterization of the immune stimulating activity of the neisserial porin PorB. *PLoS One* 8, e:82171.
- Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E., and Silhavy, T.J. (1996). From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* 20, 911-917.
- Pullen, J.K., Liang, S.M., Blake, M.S., Mates, S., and Tai, J.Y. (1995). Production of Haemophilus influenza type-b porin in Escherichia coli and its folding into the trimeric form. *Gene* 152, 85-88.
- Punternvoll, P., Kleivdal, H., Dahl, K.O., Bitter, W., Tommassen, J., and Jensen, H.B. (2000). The Fusobacterium nucleatum porin FomA possesses the general topology of the non-specific porins. *Microbiology* 146, 1437-1445.
- Punternvoll P., Ruud, M., Bruseth, L.J., Kleivdal, H., Høgh, B.T., Benz, R., and Jensen, H.B. (2002). Structural characterization of the fusobacterial non-specific porin FomA suggests a 14-stranded topology, unlike the classical porins. *Microbiology* 148, 3395-3403.
- Qi, H.L., Tai, I.J.Y., and Blake, M.S. (1994). Expression of large amounts of neisserial porin proteins in escherichia coli and refolding of the proteins into native trimers. *Infect Immun.* 62, 2432-2439.
- Ram, S., McQuillen, D.P., Gulati, S., Elkins, C., Pangburn, M.K., and Rice, P.A. (1998). Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated Neisseria gonorrhoeae. *J. Exp. Med.* 188, 671-680.
- Ram, T., Mackinnon, F.G., Gulati, S., McQuillen, D.P., Vogel, U., Frosch, M., Elkins, C., Guttormsen, H.K., Wetzler, L.M., Oppermann, M., Pangburn, M.K., and Rice, P.A. (1999). The contrasting mechanisms of serum resistance of Neisseria gonorrhoeae and group B Neisseria meningitidis. *Mol. Immunol.* 36, 915-928.

- Ram, S., Cullinane, M., Blom, A.M., Gulati, S., McQuillen, D.P., Monks, B.G., O'Connell, C., Boden, R., Elkins, C., Pangburn, M.K., Dahlbäck, B., and Rice, P.A23T. (2001). Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.* 193, 281–295.
- Richter, G. (ed.) (2003). *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken*, Georg Thieme Verlag.
- RKI, Robert Koch Institut (2011). Invasive *Haemophilus-influenzae*-Infektionen in Deutschland. Auswertung von Meldedaten nach IfSG und Typisierungsergebnissen aus dem Konsiliarlabor. *Epidemiologisches Bulletin* 271, 20669–20675.
- RKI, Robert-Koch Institut (2012). Invasive Meningokokken-Erkrankungen, 2009 – 2011. Zur Situation bei ausgewählten Infektionskrankheiten in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin* 39/2012.
- Roca, I., Espinal, P., Martí, S., and Vila, J. (2011). First identification and characterization of an 143 AdeABC-like efflux pump in *Acinetobacter* genomospecies 13TU. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1285-1286.
- Roux, B., Allen, T., Bernèche, S., and Im, W. (2004). Theoretical and computational models of biological ion channels. *Q. Rev. Biophys.* 37, 15–103.
- Rudel, T., van Putten, J.P., Gibbs, C.P., Haas, R. and Meyer, T.F. (1992). Interaction of two variable proteins (Pile and PilC) required for pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* to human epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 6, 3439–3450.
- Rudel, T., Schmid, A., Benz, R., Kolb, H.A., Lang, F., and Meyer, T.F. (1996). Modulation of *Neisseria* porin (PorB) by cytosolic ATP/ GTP of target cells: parallels between pathogen accommodation and mitochondrial endosymbiosis. *Cell* 85, 391–402.
- Rui, H., Lee, K.I., Pastor, R.W., and Im, W. (2011). Molecular dynamics studies of ion permeation in VDAC. *Biophys. J.* 100, 602–610.
- Sallantin, M., Huet, J.C., Demartean, C., and Pernollet, J.C. (1990). Reassessment of commercially available molecular weight standards for peptide sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using electroblotting and microsequencing. *Electrophoresis* 11, 34–36.
- Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F., and Rosenbusch, J.P. (1995). Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* 267, 512-514.
- Schmid, B., Maveyraud, L., Krömer, M., and Schulz, G.E. (1998). Porin mutants with new channel properties. *Protein Sci.* 7, 1603-1611.

- Schulz, G.E. (2002). The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1565, 308-317.
- Schulz, G.E. (2003). Transmembrane beta-barrel proteins. *Adv. Protein Chem.* 63, 47-70.
- Seltmann, G., and Holst, O. (2002). The bacterial cell wall. Berlin: Springer, pp. 81-82. Springer, Berlin.
- Simonet, V., Malléa, M., and Pagès, J.M. (2000). Substitutions in the eyelet region disrupt cefepime diffusion through the Escherichia coli OmpF channel. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 311–315.
- Singleton, T.E., Massari, P., and Wetzler, L.M. (2005). Neisserial porin-induced dendritic cell activation is MyD88 and TLR2 dependent. *J. Immunol.* 174, 3545-3550.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., and Martin, S.J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 144, 281-292.
- Smani, Y., Fàbrega, A., Roca, I., Sanchez-Encinales, V., Vila, J., and Pachón, J. (2013) Role of OmpA in the MDR-phenotype of Acinetobacter baumannii. *Antimicrob. Agents Chemother.*
- Smith, C.A., and Kortemme, T. (2008). Backrub-like backbone simulation recapitulates natural protein conformational variability and improves mutant side-chain prediction. *J. Mol. Biol.* 380, 742–756.
- Smyth, D.R., Mrozkiewicz, M.K., Mcgrath, W.J., Listwan, P., and Kobe, B. (2003). Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Sci.* 12, 1313-22.
- Snapper, C.M., Rosas, F.R., Kehry, M.R., Mond, J.J., and Wetzler, L.M. (1997). Neisserial porins may provide critical second signals to polysaccharide-activated murine B cells for induction of immunoglobulin secretion. *Infect. Immun.* 65, 3203–3208.
- Snijder, H.J., Ubarretxena-Belandia, I., Blaauw, M., Kalk, K.H., Verhij, H.M., Egmond, M.R., Dekker, N., and Dijkstra, B.W. (1999) Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* 401, 717-721.
- Sodoyer, R. (2004). Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *Biodrugs* 18, 51-62.
- Song, J., Minetti, C.A., Blake, M.S., and Colombini, M. (1998). Successful recovery of the normal electrophysiological properties of PorB (class 3) porin from Neisseria meningitidis after expression in Escherichia coli and renaturation. *Biochim. Biophys. Acta* 1370, 289–298.

- Squier, M.K., Miller, A.C., Malkinson, A.M. and Cohen, J.J. (1994). Calpain activation in apoptosis. *J. Cell Physiol.* 159, 229–237.
- Srikumar, R., Dahan, D., Gras, M.F., Ratcliffe, M.J., van Alphen, L., and Coulton, J.W. (1992). Antigenic sites on porin of Haemophilus influenzae type b: mapping with synthetic peptides and evaluation of structure predictions. *J. Bacteriol.* 174, 4007-4016.
- Srikumar, R., Dahan, D., Arhin, F.F., Tawa, P., Diederichs, K., and Coulton, J.W. (1997). Porins of Haemophilus influenzae type b mutated in loop 3 and in loop 4. *J. Biol. Chem.* 272, 13614-13621.
- Strop, P, and Brunger, A.T. (2005). Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins. *Protein Sci.* 14, 2207-2211.
- Suchett-Kaye, G., Décoret, D., and Barsotti, O. (1999). Intra-familial distribution of Fusobacterium nucleatum strains in healthy families with optimal plaque control. *J. Clin. Periodontol.* 26, 401-404.
- Takada, H., Ogawa, T., Yoshimura, F., Otsuka, K., Kokeguchi, S., Kato, K., Umemoto, T., and Kotani, S. (1988). Immunobiological activities of a porin fraction isolated from Fusobacterium nucleatum ATCC 10953. *Infect. Immun.* 56, 855-863.
- Tan, L.K., Carlone, G.N., and Borrow, R. (2010). Advances in the development of vaccines against Neisseria meningitidis. *N. Engl. J. Med.* 362, 1511-1520.
- Tanabe, M., Nimigean, C.M., and Iverson, T.M. (2010). Structural basis for solute transport, nucleotide regulation, and immunological recognition of Neisseria meningitidis PorB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 6811–6816.
- Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., and Shimizu, T. (2013). Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science* 339, 1426-1429.
- Toussi, D.N., Liu, X., and Massari, P. (2012a). The FomA porin from Fusobacterium nucleatum is a Toll-like Receptor 2 agonist with immune adjuvant activity. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 1093-101.
- Toussi, D.N., Carraway, M., Wetzler, L.M., Lewis, L.A., Liu, X., and Massari, P. (2012b). The amino acid sequence of Neisseria lactamica PorB surface-exposed loops influences Toll-like receptor 2-dependent cell activation. *Infect. Immun.* 80, 3417-3428.
- Urwin, R., Russell, J.E., Thompson, E.A., Holmes, E.C., Feavers, I.M., Maiden, M.C. (2004). Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: implications for vaccine design. *Infect. Immun.* 72, 5955–5962.

- Vachon, V., Lyew, D., and Coulton, J.W. (1985). Transmembrane permeability channels across the outer membrane of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Bact.* 162, 918-924.
- Van Heijenoort, J. (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11, 25-36.
- Vandeputte-Rutten, L., Kramer, R.A., Kroon, J., Dekker, N., Egmond, M.R., and Gros, P. (2001). Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *EMBO J.* 20, 5033-5039.
- Vaughan, A.T., Brackenbury, L.S., Massari, P., Davenport, V., Gorringer, A., Heyderman, R.S. and Williams, N.A. (2010). *Neisseria lactamica* Selectively Induces Mitogenic Proliferation of the Naive B Cell Pool via Cell Surface Ig. *J. Immunol.* 185, 3652-3660.
- Villinger, S., Briones, R., Giller, K., Zachariae, U., Lange, A., de Groot, B.L., Griesinger, C., Becker, S., and Zweckstetter, M. (2010). Functional dynamics in the voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 22546–22551.
- Vitiello, M., Galdiero, S., D'Isanto, M., D'Amico, M., Di Filippo, C., Cantisani, M., Galdiero, M., and Pedone, C. (2008). Pathophysiological changes of gram-negative bacterial infection can be reproduced by a synthetic peptide mimicking loop L7 sequence of *Haemophilus influenzae* porin. *Microbes Infect.* 10, 657-663.
- Vogt, J., and Schulz, G.E. (1999). The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure* 7, 1301–1309.
- Wang, Y.F., Dutzler, R., Rizkallah, P.J., Rosenbusch, J.P., and Schirmer, T. (1997). Channel specificity: structural basis for sugar discrimination and differential fluxrates in maltoporin. *J. Mol. Biol.* 272, 56-63.
- Weel, J.F.L., Hopman, C.T.P., and van Putten, J.P. (1991). Bacterial entry and intracellular processing of *Neisseria gonorrhoeae* in epithelial cells: immunomorphological evidence for alterations in the major outer membrane protein P.IB. *J. Exp. Med.* 174, 705–715.
- Weiss, M.S., and Schulz, G.E. (1992). Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 227, 493-509.
- Wen, K.K., Giardina, P.C., Blake, M.S., Edwards, J., Apicella, M.A., and Rubenstein, P.A. (2000). Interaction of the Gonococcal Porin P.IB with G- and F-Actin. *Biochemistry* 39, 8638-8647.
- Wetzler, L.M., Ho, Y., and Reiser, H. (1996). Neisserial porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. *J. Exp. Med.* 183, 1151–1159.

- Winn, M.D., Ballard, C.C., TCowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., and Wilson, K.S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 235-242.
- Yamashita, E., Zhalnina, M.V., Zakharov, S.D., Sharma, O., and Cramer, W.A. (2008). Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon. *EMBO J.* 27, 2171-2180.
- Yang, L., Zhang, X., Peng, J., Zhu, Y., Dong, J., Xu, J., Jin, Q. (2009). Distribution of surface-protein variants of hyperinvasive meningococci in China. *J. Infect.* 58, 358–367.
- Yi, K., and Murphy, T.F. (1997). Importance of an immunodominant surface-exposed loop on outer membrane protein P2 of nontypeable Haemophilus influenzae. *Infect. Immun.* 65, 150-155.
- Yildiz, O., Vinothkumar, K.R., Goswami, P., and Kühlbrandt W. (2006). Structure of the monomeric outer-membrane porin OmpG in the open and closed conformation. *EMBO J.* 25, 3702-3713.
- Yoshimura, F., Zalman, L.S, and Nikaido, H. (1983). Purification and properties of Pseudomonas aeruginosa porin. *J. Bact.* 258, 2308-2314.
- Yoshimura, F., and Nikaido, H. (1985). Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of Escherichia coli K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 84-92.
- Zachariae, U., Klühspies, T., De, S., Engelhardt, H., and Zeth, K. (2006). High resolution crystal structures and molecular dynamics studies reveal substrate binding in the porin Omp32. *J. Biol. Chem.* 28, 7413–7420.
- Zachariae, U., Schneider, R., Briones, R., Gattin, Z., Demers, J.P., Giller, K., Maier, E., Zweckstetter, M., Griesinger, C., Becker, S., Benz, R., de Groot, B.L., and Lange, A. (2012). β -Barrel mobility underlies closure of the voltage-dependent anion channel. *Structure* 20, 1540–1549.
- Zeth, K., Kozjak-Pavlovic, V., Faulstich, M., Fraunholz, M., Hurwitz, R., Kepp, O., and Rudel, T. (2013). Structure and function of the PorB porin from disseminating Neisseria gonorrhoeae. *Biochem. J.* 449, 631–642.
- Ziervogel, B.K., and Roux, B. (2013). The Binding of Antibiotics in OmpF Porin. *Structure* 21, 76-87.
- Zoratti, M, and Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 124, 139-176.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

Anhang

A.1: Oligonukleotidsequenzen (jeweils von 5' - nach 3'-Richtung angegeben)

PorB_{W135} G103D

FOR: TATTGAAAGACAGCGACGACAACGTCAATGC

REV: GCATTGACGTTGTCTGCTGTCTTTCAATA

PorB_{W135} G103K

FOR: TATTGAAAGACAGCAAGGACAACGTCAATGC

REV: GCATTGACGTTGTCTTGCTGTCTTTCAATA

PorB_{W135} G103_D104KK

FOR: TGAAAGACAGCAAGAAGAACGTCAATGCATG

REV: CATGCATTGACGTTCTTCTTGCTGTCTTTCA

PorB_{W135} G101K

FOR: AACACCGTATTGAAAAAGAGCGGCGACAACGTC

REV: GACGTTGTCGCCGCTCTTTTTCAATACGGTGTT

PorB_{W135} G103E

FOR: TATTGAAAGACAGCGAAGACAACGTCAATGC

REV: GCATTGACGTTGTCTTCGCTGTCTTTCAATA

PorB_{W135} G103R

FOR: TATTGAAAGACAGCAGAGACAACGTCAATGCA

REV: TGCATTGACGTTGTCTCTGCTGTCTTTCAATA

PorB_{W135} G103H

FOR: GTATTGAAAGACAGCCACGACAACGTCAATG

REV: CATTGACGTTGTCTGGCTGTCTTTCAATAC

PorB_{W135} G103F

FOR: TATTGAAAGACAGCTTCGACAACGTCAATG

REV: CATTGACGTTGTCTGAAGCTGTCTTTCAATA

PorB_{W135} G103M

FOR: TATTGAAAGACAGCATGGACAACGTCAATGC

REV: GCATTGACGTTGTCCATGCTGTCTTTCAATA

OmpP2

FOR: GCGCATATGGCTGTTGTTTATAACAACG

REV: TCTCTCGAGTTAGAAGTAAACGCGTAAACCTAC

sTLR2 in pMAL-c5E

FOR: GGAATTCCATATGTCTTTGTCCTGCGATAGAAATGG

REV: GGCCG GAATTCTGGGCAGATAATACTTCTAACAGG

sTLR2MBP in pDDGFP2

FOR: GGTGTCGGAATGTCACAGGACACCCTTTTAAATATAAAAAGTTCCAGTTAAA

REV: AAATTGACCTGAAAATATAAATTTTCCCCTGTCCTGTGACATTCCGACACC

A.2: Datensammlung und Statistik des *refinements* für PorB_{W135}

	R32	P6 ₃
Datensammlung		
Beamline	BESSY-II ID14.1	ESRF ID29
Wellenlänge	0,918 Å	0,976 Å
Raumgruppe	R32	P6 ₃
Einheitszelle <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	144,2, 144,2, 106,4	83,2, 83,2, 106,4
Auflösung (Å)	2,63 (2,70-2,63)	2,10 (2,15-2,10)
Anzahl der Reflexe	45623	127074
Anzahl der Einzelreflexe	11968	23050
R_{sym}	0,098 (0,442)	0,082 (0,431)
$I/\sigma(I)$	10,3 (1,86)	16,5 (1,67)
Redundanz	3,8 (2,8)	5,5 (4,4)
Vollständigkeit (%)	94,3 (76,3)	97,4 (75,8)
Wilson plot B	72,2	35,8
Refinement		
Auflösung	2,63	2,12
R_{work} (%)	23,5	20,9
R_{free} (%)	28,0	25,3
Anzahl der Atome (Protein)	2593	2619
Anzahl der Atome (Cs)	4	3
Anzahl der Atome (Wasser)	12	95
B-Faktoren (Durchschnitt)	51,3	47,3
B-Faktoren (Cs)	65,5	77,6
B-Faktoren (Wasser)	41,6	44,5
R. m. s Abweichung vom Ideal		
Bindungslänge (Å)	0,016	0,017
Bindungswinkel (°)	1,908	1,910
Ramachandran Analyse		
AS in Kernregion	92,5%	90,1%
AS in erlaubter Region	7,5%	9,9%
AS in verbotener Region	0%	0%

$$R_{merge} = \frac{\sum h \sum i |I_{h,i} - \langle I_h \rangle|}{\sum h \sum i I_{h,i}}$$

$$R_{work} \text{ is the } R\text{-factor} = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$$

R_{free} berechnet aus R_{work} für ein Test-Set, der 5% der Reflexe enthält, die nicht für das Refinement genutzt wurden.

Zahlenwerte in Klammern stellen die entsprechenden Werte für die höchste Auflösungsschale dar.

A.3: Datensammlung des anomalen Signals von Cs⁺.

	R32	R32	P6 ₃	P6 ₃
Datensammlung				
Beamline	SLS X06DA	SLS X06DA	SLS X06DA	SLS X06DA
Wellenlänge	2,00 Å	2,00 Å	2,00 Å	2,00 Å
Raumgruppe	R32	R32	P6 ₃	P6 ₃
Einheitszelle <i>a, b, c</i> (Å)	147,8 147,8, 110,9	149,1, 149,1, 112,4	84,7, 84,7, 106,5	83,0, 83,0, 105,4
Auflösung (Å)	50-3,75 (3,84-3,75)	50-3,75 (3,84-3,5)	40-3,30 (3,38-3,30)	50-3,95 (4,04-3,95)
Anzahl der Reflexionen	26487	17644	65911	32062
Anzahl der Einzelreflexe	4660	4795	6660	3727
R_{sym}	0,093 (0,153)	0,124 (0,226)	0,086 (0,518)	0,089 (0,227)
$I/\sigma(I)$	14,6 (9,4)	8,68 (4,55)	23,0 (3,36)	22,4 (8,3)
Redundanz	5,7 (5,3)	3,7 (2,6)	9,9 (9,4)	8,6 (8,6)
Vollständigkeit (%)	94,9 (93,7)	94,8 (92,2)	100 (100)	99,9 (100)
Wilson plot B	49,2	76,1	108,9	57,7

$$R_{sym} = \frac{\sum h \sum i |I_{h,i} - \langle I_h \rangle|}{\sum h \sum i I_{h,i}}$$

A.4: Datensammlung und Statistik des *refinements* von PorB_{W135} G103K und G103D

	G103K	G103D
Datensammlung		
Beamline	SLS PX-I	SLS PX-I
Wellenlänge	1,00	1,00
Raumgruppe	P6 ₃	P6 ₃
Einheitszelle <i>a, b, c</i> (Å)	84,4, 84,4, 107,1	82,3, 82,3, 106,1
Auflösung (Å)	2,75 (2,81-2,75)	2,50 (2,55-2,50)
Anzahl der Reflexe	75393	83726
Anzahl der Einzelreflexe	11220	13738
R_{sym}	0,077 (0,394)	0,086 (0,335)
$I/\sigma(I)$	22,7 (2,22)	19,5 (4,59)
Redundanz	6,7 (7,1)	6,1 (5,5)
Vollständigkeit (%)	99,8 (100)	96,9 (99,9)
Wilson plot B	85,992	75,737
Refinement		
Auflösung	2,75	2,50
R_{work} (%)	22,4	21,3
R_{free} (%)	26,5	26,2
Anzahl der Atome (Protein)	2624	2623
B-Faktoren (Durchschnitt)	82,26	56,95
R. m. s Abweichung vom Ideal		
Bindungslänge (Å)	0,015	0,015
Bindungswinkel (°)	1,920	1,920
Ramachandran Analyse		
AS in Kernregion	94,9%	94,6%
AS in erlaubter Region	5,1%	5,4%
AS in verbotener Region	0%	0%

A.5: Datensammlung des anomalen Signals von Schwefel in der PorB_{W135}-G103D-Struktur nach Ampicillin-soaking.

	P6 ₃	P6 ₃
Datensammlung		
Beamline	SLS PX-II	SLS PX-II
Wellenlänge	2,00 Å	2,00 Å
Raumgruppe	P6 ₃	P6 ₃
Einheitszelle <i>a, b, c</i> (Å)	82,97, 98,97, 106,6	85,08, 85,08, 106,95
Auflösung (Å)	50-3,90 (3,98-3,90)	50-4,00 (4,09-4,00)
Anzahl der Reflexionen	18772	19873
Anzahl der Einzelreflexe	3752	3754
R_{sym}	0,090 (0,471)	0,124 (0,506)
$I/\sigma(I)$	13,9 (4,0)	11,7 (1,8)
Redundanz	5,0 (4,9)	5,3 (4,5)
Vollständigkeit (%)	96,8 (97,6)	99,6 (97,4)

A.6: Datensammlung und Statistik des *refinements* von PorB_{W135}.

	P6 ₃
Datensammlung	
Beamline	SLS PX-III
Wellenlänge	1,0 Å
Raumgruppe	P6 ₃
Einheitszelle <i>a, b, c</i> (Å)	82,3, 82,3, 106,2
Auflösung (Å)	1,78 (1,82-1,78)
Anzahl der Reflexe	113577
Anzahl der Einzelreflexe	37845
R_{sym}	0,059 (0,463)
$I/\sigma(I)$	15,5 (1,9)
Redundanz	3,0 (3,0)
Vollständigkeit (%)	96,4 (96,9)
Refinement	
Auflösung	1,78 Å
R_{work} (%)	20,68
R_{free} (%)	23,85
Anzahl der Atome (Protein)	2619
Anzahl der Atome (Cs)	3
Anzahl der Atome (Wasser)	93
B-Faktoren (Durchschnitt)	25,87
B-Faktoren (Cs)	66,02
B-Faktoren (Wasser)	26,47
<i>R. m. s</i> Abweichung vom Ideal	
Bindungslänge (Å)	0,018
Bindungswinkel (°)	1,960
Ramachandran Analyse	
AS in Kernregion	94,3%
AS in erlaubter Region	5,7%
AS in verbotener Region	0%

A.7: Datensammlung und Statistik des *refinements* von PorB_B und PorB_{AKR}.

	PorB _B	PorB _{AKR}
Datensammlung		
Beamline	SLS PX-II	SLS PX-III
Wellenlänge	1,00 Å	1,00 Å
Raumgruppe	R32 (H32)	R32 (H32)
Einheitszelle <i>a, b, c</i> (Å)	148,3, 148,3, 104,0	143,4, 143,4, 178,4
Auflösung (Å)	50-3,30 (3,37-3,30)	50-2,40 (2,45-2,40)
Anzahl der Reflexe	17921	171041
Anzahl der Einzelreflexe	6628	27700
R _{sym}	0,099 (0,280)	0,084 (0,500)
I/σ (I)	9,55 (3,54)	17,4 (1,55)
Redundanz	2,9 (2,8)	6,7 (3,9)
Vollständigkeit (%)	92,8 (76,9)	92,2 (73,0)
Refinement		
Auflösung	3,30	2,40
R _{work} (%)	25,4	22,7
R _{free} (%)	29,3	25,6
Anzahl der Atome	2380	2501
Protein	2380	2393
Zitrat	-	26
Wasser	-	82
B-Faktor (Protein)	56,6	50,6
B-Faktor (Zitrat)	-	93,9
B-Faktor (Wasser)	-	51,3
<i>R. m. s.</i> Abweichung vom Ideal		
Bindungslänge (Å)	0,012	0,016
Bindungswinkel (deg)	1,93	1,63
Ramachandran plot		
AS in Kernregion	90,1%	90,6%
AS in erlaubter Region	9,9%	9,4%
AS in verbotener Region	0%	0%

A.8: Aminosäure- und Nukleotidsequenzen verwendeter sTLR2-Konstrukte.

P. pastoris Expressionskonstrukt sTLR2VLRB

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLLEGDFDVAVLFPFSNSTNNGLLFINTTIIASIAA
KEEGVSLEKREAEAAGSLSCDRNGICKGSSGSLNSIPSGLTEAVKSLDLSNNRITYISNSDLQRCVNLQALVLT
NGINTIEEDSFSSLSLEHLDLSSYNYLSNLSSSWFKPLSSLTFLNLLGNPYKTLGETSLFSLTKLQILRVGNMD
TFTKIQRKDFAGLTFLEELEIDASDLQSYEPKSLKSIQNVSHLILHMKQHILLEIFVDVTSSVECLELRDTDLD
TFHFSELSTGETNSLIKKFTFRNVKITDESLEFQVMKLLNQISGLLELEFDDCTLNGVGNFRASDNDRVIDPGKVE
TLTIRRLHIPRFYLFYDLSTLYSLTERVKRITVENSKVFLVPCLLSQHLKSLEYLDLSENLMVEEYLNKSACEDA
WPSLQTLILRQNHASLEKTGETLLTLKNLTNIDISKNSFHSMPETCQWPEKMKYLNLSSTRIHSVTGCI PKTLE
ILDVSNLNLNLFSLNLPQLKELYISRNKMLTLPDASLLPMLLVLKI SRNQLKSVPDGIFDRLTSLQKIWLHTNPW
DCSCPRIIDYLSRWLNKNSQKEQGSAKCSGSGKPVRSIICPVDHHHHHH-

ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACA
ACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAAGGGATTTTCGATGTT
GCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATGCTGCT
AAAGAAGAAGGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCATCGATGAATTCGATGAAAATCGAAGAAGGTA
CTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAAATCGAGAAAGATA
GGAATTAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGC
CCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCG
GACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTAC
CCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAG
ATCCCGGCGCTGGATAAAGAAGCTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCCTACTTC
ACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGTGCATTATGCGTTCAAGTATGAAAAACGGCAAGTACGACATTAAGACGTG
GGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCTGGTTGACCTGATTAACAAACACATGAATGCA
GACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCCGTGGGCA
TGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAA
CCGTTCTGTTGGCTGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAAAGAGTTCCTCGAA
AATCATCTGCTGACTGATGAAGTCTGGAAGCGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCT
TACGAGGAAGAGTTGGTGAAAGATCCGCTATTGCCCGCCACTATGGAAAACGCCAGAAAGGTGAAATCATGCCG
AACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCCGTGATCAACGCCGCCAGCGGTGCTCAGACT
GTCGATGAAGCCCTGAAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAAACAACAATAACAATAACAACAACCTC
GGGGATGACGATGACAAGGTACCGCATATGTCTTTGTCTGCGATAGAAAATGGAACTCTGTAAGGGTTCATCTGGT
TCATTAATAGTATCCCAAGTGGTTTACTGAGGCGTCAAGTCTTGGACTTGAGTAACAACAGAATCACTTAC
ATCAGTAACTCTGATTTGCAAAGATGTGTTAATTTGCAGGCTTTAGTCTTGACTTCTAACGGTATTAATACAATC
GAAGAGGACTCTTTCTCTCATTAGGATCATTGGAACATTTGGATTTGTCTTACAACACTTATCAAATTTGTCC
AGTTCTTGGTTTAAAGCCATTATCATCCTTGACCTTCTTAACTTGTGGGTAACCTTACAAGACTTTGGGAGAA
ACATCATTGTTTTCCCACTTGACTAAGTTACAGATCTTGAGAGTTGTTAACATGGACACTTTCACAAAGATCCAA
AGAAAGGATTTGCCCGGATTGACATCTTGGAAAGAGTTAGAAATCGACGCTTCTGATTTGCAATCATACGAGCCA
AAGAGTTTGAAGTCTATCCAGAACGTTTCTCATTTGATCTTGACATGAAGCAACATATCTTGTGTTGGAAATC
TTCGTTGATGTCACCAGTTCTGTTGAATGTTTAGAGTTGAGAGATACCGACTTGGAATACTTTTCATTTCTCAGAA
TTGTCCACAGGAGAGACCAACTCATTGATTAAGAAAGTTTACCTTCAGAAAACGTTAAGATCACTGATGAATCCTTG
TTCCAAGTCATGAAGTTGTTGAATCAAATTTCTGGTTTATTGGAAATGGAGTTTGTGACTGCACCTTTGAACGGT
GTTGGAAATTTAGAGCATCTGACAATGATAGAGTTATTGACCCAGGAAAGGTCGAAACCTTAACTATTAGAAGA
TTGCACATCCCTAGATTCTATTTGTTCTACGATTTGTCCACATTTGTACAGTTTGACCGAAAGAGTTAAGAGAATT
ACTGTCGAGAACTCTAAGGTTTTCTTGGTCCCAGTGTATTGTTGCCAACATTTGAAGAGTTTGGAAATATTTGGAC
TTGTGAGAGAACTTAATGGTTGAAGAGTACTTGAATAATCCGCTTGGCAAGATGCATGGCCTAGTTTGCAAACA
TTGATCTTGAGACAGAACCCTTAGCATCTTTGGAAAAGACTGGAGAGACATTTATGACCTTAAAGAACTTGACT
AACATCGATATCAGTAAAAACTCTTTCCACTCAATGCCAGAAAACATGTCAATGGCCTGAGAAAATGAAGTATTTG
AATTTGTCATCCACCAGAATCCATTCTGTTACTGGATGCATTTCAAAGACATTAGAAAATCTTGGATGTCTCTAAC
AACAATTTGAACTTGTCTCATTAAATTTGCCTCAATTTGAAGGAGTTGTACATCTCCAGAAACAAGTTAATGACA
TTGCCAGATGCCAGTTTGTGCTATGTTATTGGTTTTGAAGATCTCCAGAAATCAGTTGAAGAGTGTCCCTGAC
GGTATCTTCGATAGATTGACATCATTGCAAAAAGATTTGGTTGCATACCAATCCATGGGACTGTTCTGCCCTAGA
ATCGATTACTTATCTAGATGGTTGAACAAAAATTCACAAAAGGAACAAGGTTTCAGCAAAGTGTAGTGGTAGTGA
AAGCCTGTTAGAAGTATTATCTGCCAGTCGACCATCATCATCATCATTTGA

S. cerevisiae Expressionskonstrukt MBP sTLR2VLRB GFP

MKIKTGARILALSALTMMFSASALAKIEEGKLVWINGDKYNGLAIEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQ
 VAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALS LIYNKDLLPN
 PPKTWEEIIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDIKDVGVNDAGAKAGLTFVLVDLI
 KNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPFTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKE
 LAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNI PQMSAFWYAVRTAVIN
 AASGRQTVDEALKDAQTNSSNNNNNNNNNNLGDGDDKVPVSLSCDRNGICKGSSGSLNSIPSGLTEAVKSLDLSN
 NRITYISNSDLQRCVNLQALVLTSTNGINTIEEDSFSSLSLEHLDLSYNYLSNLSSWFKPLSSLTFNLNLLGNPY
 KTLGETSLFSLTKLQILRVGNMDFTKIQRKDFAGLTFLEELEIDASDLQSYEPKSLKSIQNVSHLILHMKQHI
 LLEIFVDVTSVECLELRDLDLDFHFSELSTGETNSLIKKFTFRNVKITDESLEFQVMKLLNQISGLELEFDD
 CTNLGVGNFRASDNDRVIDPGKVETLTIRRLHIPRFYLFYDLSTLYSLTERVKRITVENSKVFLVPCLLSQHLKS
 LEYLDLSENLMVEEYLKNSACEDAWPSLQTLILRQNHASLEKTGETLLTLKNLTNIDISKNSFHSMPEQCQWPE
 KMXYLNLSSSTRIHSVTGCIPKLTLEILDVSNNNLNLFSNLPLQKELYISRNKMLTLPDASLLPMLLVLKI SRNQL
 KSVPDGIFDRLTSLQKIWLHTNPWDCSCPRIDYLSRWLNKNSQKEQGSASCSGSGKPVRSIICPEFENLYFQGMS
 KGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYKGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDH
 MKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNHNVYI
 MADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTA
 A GITHGMDELYKHHHHHHHHH-

ATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGT
 AAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAGTCAACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATCCCACAG
 GTTGGCGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGC
 CTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTAC
 AACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAAC
 CCGCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTT
 AACCTGCAAGAACCCTACTTACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGTGCATTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGC
 AAGTACGACATTAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGGAAAGCGGCTGACCTTCTGGTTGACCTGATT
 AAAAACAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGCGAAACAGCGATG
 ACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACC
 TTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAG
 CTGGCAAAAGAGTTCTCGAAAACCTATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTG
 GGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGTGAAGATCCGCGTATGCGCGCCACTATGGAACCGCC
 CAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTCTGGTATGCCGTGCCGTACTGCCGTGATCAAC
 GCCGCCAGCGGTCTGACTGTGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAAC
 AATAACAATAACAACAACCTCGGGGATGACGATGACAAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGCTCTTTGCTCC
 TGCGATAGAAATGGAATCTGTAAGGGTTCATCTGGTTCATTAATAAGTATCCCAAGTGGTTGAGCTGAGGCGCTC
 AAGTCTTGGACTTGAGTAACAACAGAATCACTTACATCAGTAACTCTGATTTGCAAAGATGTGTTAATTTGCAG
 GCTTTAGTCTTGACTTCTAACGGTATTAATACAATCGAAGAGGACTCTTCTCTTCATTAGGATCATTGGAACAT
 TTGGATTTGTCTTACAACACTTATCAAATTTGTCCAGTCTTGGTTTAAAGCCATTATCATCCTTGACCTTCTTA
 AACTTGTGGGTAACCTTACAAGACTTTGGGAGAAAACATCATTGTTTTCCCACTTGACTAAGTTACAGATCTTG
 AGAGTTGGTAACATGGACACTTTCACAAAGATCCAAAGAAAGGATTTCCGCCGATGACATTCTTGAAGAGTTA
 GAAATCGACGCTTCTGATTTGCAATCATAACGACGCAAGAGTTTGAAGTCTATCCAGAACGTTTCTCATTGATC
 TTGCACATGAAGCAACATATCTTGTGTTGAAATCTTCGTTGATGTCACCAGTCTGTTGAATGTTTAGAGTTG
 AGAGATACCGACTTGGATACTTTTCATTTCTCAGAATTGTCCACAGGAGAGACCAACTCATTGATTA AAAAGTTT
 ACCTTCAGAAACGTTAAGATCACTGATGAATCCTTGTTCAGATCATGAAGTTGTTGAATCAAATTTCTGGTTTA
 TTGGAATTTGGAGTTTGATGACTGCACTTTGAACGGTGTGGAAATTTAGAGCATCTGACAATGATAGAGTTATT
 GACCCAGGAAAGGTGAAACCTTAACTATTAGAAGATTGCACATCCCTAGATTCTATTTGTTCTACGATTTGTCC
 ACATTGTACAGTTTGACCGAAAAGATTAAAGAGAATTAAGTGTGCGAAGCTTAAGGTTTCTTGGTCCCATTGTTA
 TTGTCCCAACATTTGAAGAGTTTGAAGATTTTGGACTTGTGAGAGAACTTAATGGTTGAAGAGTACTTGA AAAAT
 TCCGCTTGCAGAGATGCATGGCCTAGTTTGC AAACATTTGATCTTGAGACAGAACCACTTAGCATCTTTGGAAAAG
 ACTGGAGAGACATTATTGACCTTAAAGAACTTGACTAACATCGATATCAGTAAAAACTCTTTCCACTCAATGCCA
 GAAACATGTCAATGGCCTGAGAAAATGAAGTATTTGAATTTGTATCCACCAGAAATCCATTCTGTTACTGGATGC
 ATTTCCAAAGACATAGAAATCTTGGATGCTCTGACAAACAATTTGAACCTGTTCTCATTAATTTGCCTCAATTTG
 AAGGAGTTGTACATCTCAGAAAACAAGTTAATGACATTTGCCAGATGCCAGTTTGTGCTTATGTTATGGTTTTG
 AAGATCTCCAGAAATCAGTTGAAGAGTGTCCCTGACGGTATCTTCGATAGATTGACATCATTGCAAAAAGATTTGG
 TTGCATACCAATCCATGGGACTGTTCCCTGCCCTAGAATCGATTACTTATCTAGATGGTTGAACAAAATTCACAA
 AAGGAACAAGGTTAGCAAGGTAGTGGTAGTGGAAAAGCCTGTTAGAAAGTATTATCTGCCCAGAAATTCATGAGT
 AAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTTGTGTTGAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACAAATTT
 TCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAA
 CTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCAT

A.9 Aminosäure- und Nukleotidsequenzen verwendeter Porin-Konstrukte.

Die PorB_{W135}-Mutanten G103D, G103K, G103E, G103R, G103H, G103F und G103M hatten eine identische Aminosäuresequenz wie PorB_{W135}, nur mit dem entsprechenden Aminosäureaustausch an der hervorgehobenen (rot) Position.

PorB_{W135}

QVTLYGTIKAGVEVSRVKDAGTYKAQGGKSKTATQIADFGSKIGFKGQEDLGNMKAIWQLEQKAS IAGTNSGWG
NRQSF IGLKGGFGTVRAGNLNTVLKDS **G**DNVNAWESGSNTEDVLGLGTIGRVESREISVRYDSPVFAGFSGSVQY
VPRDNANDVDKYKHTKSSRESYHAGLKYENAGFFGQYAGSFAKYADLNTDAERVAVNTANAHPKDYQVHRVVAG
YDANDLYVSVAGQYEAANKNEVGS IKGKKHEQTQVAATAAYRFGNVTPRVSYAHGFKAKVNGVKDANYQYDQVIV
GADYDFSKRTSALVSAGWLKQKGAGKVEQTASMVGLRHKF

GAAGTTTCTCGCGTAAAAGATGCTGGTACATATAAAGCTCAAGGCGGAAAAATCTAAAACCTGCAACCCAAATTGCC
GACTTCGGTTCTAAAATCGGTTTCAAAGGTCAAGAAGACCTCGGCAACGGCATGAAAGCCATTTGGCAGTTGGAA
CAAAAAGCCTCCATCGCCGGCACTAACAGCGGCTGGGGTAACCGCCAGTCCTTCATCGGCTTGAAAGCGGCTTC
GGTACCGTCCGCGCCGGTAATCTGAACACCGTATTGAAAGACAGC **GGC**GACAACGTCAATGCATGGGAATCTGGT
TCTAACACCGAAGATGTACTGGGACTGGGTACTATCGGTCTGTAGAAAAGCCGTGAAATCTCCGTACGCTACGAC
TCTCCCGTATTTGCAGGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGTTCCGCGCGATAATGCGAATGATGTGGATAAATAC
AAACATACGAAGTCCAGCCGTGAGTCTTACCACGCGGCTCTGAAATACGAAAAATGCCGGTTTTCTTCGGTCAATAC
GCAGGTTCTTTTGCCAAATATGCTGATTTGAACACTGATGCAGAACGTGTTGCAGTAAATACTGCAAATGCCCAT
CCTGTAAAGGATTACCAAGTACACCGGTAGTTGCCGGTTACGATGCCAATGACCTGTACGTTTCTGTTGCCGGT
CAGTATGAAGCTGCTAAAAACAACGAGGTTGGTTCTATCAAGGGTAAAAAACACGAGCAAACCTCAAGTTGCCGCT
ACTGCCGCTTACCGTTTTGGCAACGTAACGCTCGGTTTTCTTACGCCACGGCTTCAAAGCTAAAGTGAATGGC
GTGAAAGACGCAAATTACCAATACGACCAAGTTATCGTTGGTGCCGACTACGACTTCTCCAAACGCACCTCCGCT
CTGGTTTTCTGCCGGTTGGTTGAAACAAGGTAAAGGCGCGGAAAAAGTCGAACAAACTGCCAGCATG

Die Mutation in der Nukleotidsequenz an der Position 103 (Wildtyp: GGC) ist rot hervorgehoben. Die Veränderung der Sequenz ist nachfolgend für alle G103-Mutanten gezeigt.

G103D: GAC, G103K: AAG, G103E: CGA, G103R: AGG, G103H: CAC, G103F: TTC,
G103M: ATG

PorB_{W135}-G103K_D104K

QVTLYGTIKAGVEVSRVKDAGTYKAQGGKSKTATQIADFGSKIGFKGQEDLGNMKAIWQLEQKAS IAGTNSGWG
NRQSF IGLKGGFGTVRAGNLNTVLKDS **KK**NVNAWESGSNTEDVLGLGTIGRVESREISVRYDSPVFAGFSGSVQY
VPRDNANDVDKYKHTKSSRESYHAGLKYENAGFFGQYAGSFAKYADLNTDAERVAVNTANAHPKDYQVHRVVAG
YDANDLYVSVAGQYEAANKNEVGS IKGKKHEQTQVAATAAYRFGNVTPRVSYAHGFKAKVNGVKDANYQYDQVIV
GADYDFSKRTSALVSAGWLKQKGAGKVEQTASMVGLRHKF

GAAGTTTCTCGCGTAAAAGATGCTGGTACATATAAAGCTCAAGGCGGAAAAATCTAAAACCTGCAACCCAAATTGCC
GACTTCGGTTCTAAAATCGGTTTCAAAGGTCAAGAAGACCTCGGCAACGGCATGAAAGCCATTTGGCAGTTGGAA
CAAAAAGCCTCCATCGCCGGCACTAACAGCGGCTGGGGTAACCGCCAGTCCTTCATCGGCTTGAAAGCGGCTTC
GGTACCGTCCGCGCCGGTAATCTGAACACCGTATTGAAAGACAGC **GGC**GACAACGTCAATGCATGGGAATCT
GGTTCTAACACCGAAGATGTACTGGGACTGGGTACTATCGGTCTGTAGAAAAGCCGTGAAATCTCCGTACGCTAC

GACTCTCCCGTATTTGCAGGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGTTCCGCGCGATAATGCGAATGATGTGGATAAA
 TACAAACATACGAAGTCCAGCCGTGAGTCTTACCACGCCGGTCTGAAATACGAAAATGCCGGTTTCTTCGGTCAA
 TACGCAGGTTCTTTTGCCAAATATGCTGATTTGAACACTGATGCAGAACGTGTTGCAGTAAACTGCAAATGCC
 CATCCTGTTAAGGATTACCAAGTACACCCGCGTAGTTGCCGGTTACGATGCCAATGACCTGTACGTTTCTGTTGCC
 GGTACAGTATGAAGCTGCTAAAAACAACGAGGTTGGTTCTATCAAGGGTAAAAACACGAGCAAACCTCAAGTTGCC
 GCTACTGCCGCTTACCGTTTTGGCAACGTAACGCCTCGCGTTTCTTACGCCACGGCTTCAAAGCTAAAGTGAAT
 GCGGTGAAAGACGCAAATTACCAATACGACCAAGTTATCGTTGGTGCCGACTACGACTTCTCAAACGCACTTCC
 GCTCTGGTTTTCTGCCGGTTGGTTGAAACAAGGTAAAGGCGCGGAAAAAGTCGAACAAACTGCCAGCATG

PorB_{W135}-D101K

QVTLYGTIKAGVEVSRVKDAGTYKAQGGKSKTATQIADFGSKIGFKGQEDLNGMKAIWQLEQKAS IAGTNSGWG
 NRQSFIGLKGFGTVRAGNLNTVLK^RSGDNVNAWESGSNTEDVLLGLTIGRVESREISVRYDSPVFAGFSGSVQY
 VPRDNANDVDKYKHTKSSRESYHAGLKYENAGFFGQYAGSFAKYADLNTDAERVAVNTANAHPVKDYQVHRVAG
 YDANDLYVSVAGQYEAAKNNEVGS IKGKKHEQTQVAATAAYRFGNVTPRVSYAHGFKAKVNGVKDANYQYDQVIV
 GADYDFSKRTSALVSAGWLKQKGAGKVEQTASMVGLRHKF

GAAGTTTCTCGCGTAAAAGATGCTGGTACATATAAAGCTCAAGGCGGAAAAATCTAAAACCTGCAACCCAAATTGCC
 GACTTCGGTTCTAAAATCGGTTTCAAAGGTCAAGAAGACCTCGGCAACGGCATGAAAGCCATTTGGCAGTTGGAA
 CAAAAGCCTCCATCGCCGGCACTAACAGCGGCTGGGGTAACCGCCAGTCCCTTCATCGGCTTCAAAGGCGGCTTC
 GGTACCGTCCGCGCCGGTAATCTGAACACCGTATTGAAA^{AAG}AGCGGCGACAACGTCAATGCATGGGAATCTGGT
 TCTAACACCGAAGATGACTGGGACTGGGTACTATCGGTCGTGTAGAAAAGCCGTGAAAATCTCCGTACGCTACGAC
 TCTCCCGTATTTGCAGGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGTTCCGCGCGATAATGCGAATGATGTGGATAAATAC
 AAACATACGAAGTCCAGCCGTGAGTCTTACCACGCCGGTCTGAAAATACGAAAATGCCGGTTTTCTTCGGTCAATAC
 GCAGGTTCTTTTGCCAAATATGCTGATTTGAACACTGATGCAGAACGTGTTGCAGTAAACTGCAAATGCCCAT
 CCTGTAAAGGATTACCAAGTACACCGCGTAGTTGCCGGTTACGATGCCAATGACCTGTACGTTTCTGTTGCCGGT
 CAGTATGAAGCTGCTAAAAACAACGAGGTTGGTTCTATCAAGGGTAAAAACACGAGCAAACCTCAAGTTGCCGCT
 ACTGCCGCTTACCGTTTTGGCAACGTAACGCCTCGCGTTTCTTACGCCACGGCTTCAAAGCTAAAGTGAATGGC
 GTGAAAGACGCAAATTACCAATACGACCAAGTTATCGTTGGTGCCGACTACGACTTCTCAAACGCACTTCCGCT
 CTGGTTTTCTGCCGGTTGGTTGAAACAAGGTAAAGGCGCGGAAAAAGTCGAACAAACTGCCAGCATG

OmpP2

MAVVYNNEGTNVELGGRLSIIAEQSNSTVDNQKQGHGALRNQGSRFHIKATHNFGDGFYAQGYLETRFVTKASEN
 GSDNFGDITSKYAYVTLGNKAFGEVKLGRAKTIADGITS AEDKEYGVLNNSDYIPTSGNTVGYTFKGI DGLVLGA
 NYLLAQKREGAKNTNKQPNDKAGEVRI GEINNGIQVGAKYDANDIVAKIAYGRNTYKYNEADEHTQQLNGVLATL
 GYRFSDLGLLVSLDSGYAKTKNYKTKHEKRYFVSPGFQYELMEDTNVYGNFKYERTSVDQGEKTRQAVLFGVDH
 KLHKQLLTYIEGAYARTKTTNGGVKTEKEKSVGVGLRVYF

ATGAAAAAACACTTGCAGCATTAAATCGTTGGTGCAATTCGCAGCTTCAGCAGCAAACGCAGCTGTTGTTTTATAAC
 AACGAAGGGACTAACGTAGAATTAGGTGGTCGTTTAAAGCATTATCGCAGAACAAGTAATAGCACTGTAGATAAT
 CAAAACAGCAACACGGTGCATTACGCAATCAAGGTTACGTTTTCCACATTAAGCAACTCATAACTTCGGTGAT
 GGTTCCTATGCACAAGGTTATTTAGAAAACGTTTTGTTACAAAAGCCTCTGAAAACGGTTCAGATAACTTCGGT
 GATATTACAAGCAAATATGCTTATGTTACTTTAGGAAATAAAGCATTTCGGTGAAGTAAAACCTGGTTCGTGCGAAA
 ACTATTGCTGATGGCATAACAAGCGCAGAAGATAAAGAATATGGCGTTCTCAACAATAGTACTATATTCCTACT
 AGTGGAATAACCGTTGGCTATACTTTTAAAGGTATTGATGGTTTAGTATTAGGCGCTAATTTATTTATTAGCACAA
 AAGCGTGAGGGTGCAAAAAATACAAATAAGCAGCCTAATGATAAGGCTGGTGAAGTACGTATAGGTGAAATCAAT
 AATGGAATTCAAGTTGGTGCAAAATATGATGCAAACGACATCGTTGCAAAAATGCTTATGGTAGAACCTAATAC
 AAATATAACGAAGCTGACGAGCATAACAGCAATTAATGGTGTATTAGCAACTTTAGGCTATCGTTTTAGTGAT
 TTAGGCTTATTAGTGTCTCTAGATAGTGGCTATGCAAAAACCTAAAACTATAAACTAAACACGAAAAACGCTAT
 TTCGTATCTCCAGGTTTCCAATATGAATTAATGGAAGATACTAATGTCTATGGCAACTTCAAATATGAACGCACT
 TCTGTAGATCAAGGTGAAAAACACGTGAACAAGCAGTATTATTCGGTGTAGATCATAAACTCACAAAACACTA
 TTAACCTATATTGAAGGTGCTTACGCTAGAACAATAAAACACTAATGGAGGCGTAAAAACTGAAAAAGAAAAATCA
 GTGGGTGTAGGTTTACGCGTTTACTTCTAA

PorB_B

DVTLYGTIKAGVETSRSVFHQNGQVTEVTTATGIVDLGSKI GFKGQEDLGNLKAIWQVEQKAS IAGTDSGWGNR
 QSF IGLKGGFGKLRVGR LNSVLKDTGDINP WDSKSDYLGVN KIAEPEARLISVRYDSPEFAGLSGSVQYALNDNA
 GRHNSESYHAGFNYKNGGFFVQYGGAYKRHHQVQEGLNIEKYQIHR L VSGYDNDALYASVAVQQQDAKLTDASNS
 HNSQTEVAATLAYRFGNVT PRVSYAHGFKGLVDDADIGNEYDQVVVGA EYDFSKRTSALVSAGWLQEGKGENKFV
 ATAGGVGLRHKF

ATGAAAAAATCCCTGATTGCCCTGACTTTGGCAGCCCTTCCTGTTGCAGCAATGGCTGACGTTACCTGTACGGC
 ACCATCAAAGCCGGCGTAGAAACTTCCCCTCTGTATTTACCAGAACGGCCAAGTTACTGAAGTTACAACCGCT
 ACCGGCATCGTTGATTTGGGTTTCGAAAATCGGCTTCAAAGGCCAAGAAGACCTCGGTAACGGCCTGAAAGCCATT
 TGGCAGGTTGAGCAAAAAGCATCTATCGCCGGTACTGACTCCGGTTGGGGCAACCGCCAATCCTTCATCGGCTTG
 AAAGGCGGCTTCGGTAAATTGCGCGTCCGGTCGTTTGAACAGCGTCTGAAAGACACCGGCGACATCAATCCTTGG
 GATAGCAAAAAGCGACTATTTGGGTGTAAACAAAATTGCCGAACCCGAGGCACGCCTCATTTCCGTACGCTACGAT
 TCTCCCGAATTTGCCGGCCTCAGCGGCAGCGTACAATACGCGCTTAACGACAATGCAGGCAGACATAACAGCGAA
 TCTTACCACGCCGGCTTCAACTACAAAAACGGTGGCTTCTTCGTGCAATATGGCGGTGCCATAAAAAGACATCAT
 CAAGTGCAAGAGGGCTTGAATATTGAGAAAATACCAGATTCACCGTTTGGTCAGCGGTTACGACAATGATGCCCTG
 TACGCTTCCGTAGCCGTACAGCAACAAGACGCGAAAATGACTGATGCTTCCAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAA
 GTTGGCCGTACCTTGGCATAACCGCTTCGGCAACGTAACGCCCCGAGTTTCTTACGCCACGGCTTCAAAGGTTTG
 GTTGATGATGCAGACATAGGCAACGAATACGACCAAGTGGTTGTTCGGTGCAGGAAACGACTTCTCAAACGCACT
 TCTGCCTTGGTTTCTGCCGGTTGGTTGCAAGAAGGCAAAGGCGAAAAACAAATTCGTAGCGACTGCCGGCGGTGTC
 GGTCTGCGCCACAAATTCTAA

PorB_{AKR}

DVTLYGTIKAGVETSRSVFHQNGQVTEVTTATGIVDLGSKI GFKGQEDLGNLKAIWQVEQKAS IAGTDSGWGNR
 QSF IGLKGGFGKLRVGR LNSVLKDTGDINP WDSKSDYLGVN KIAEPEARLISVRYDSPEFAGLSGSVQYALNDNA
 GRHNSESYHAGFNYKNGGFFVQYGGAYKRHHQVQEGLNIEKYQIHR L VSGYDNDALYASVAVQQQDAKLTDASNS
 HNSQTEVAATLAYRFGNVT PRVSYAHGFKGLV**AK**ADIGN**RY**DQVVVGA EYDFSKRTSALVSAGWLQEGKGENKFV
 ATAGGVGLRHKF

ATGAAAAAATCCCTGATTGCCCTGACTTTGGCAGCCCTTCCTGTTGCAGCAATGGCTGACGTTACCTGTACGGC
 ACCATCAAAGCCGGCGTAGAAACTTCCCCTCTGTATTTACCAGAACGGCCAAGTTACTGAAGTTACAACCGCT
 ACCGGCATCGTTGATTTGGGTTTCGAAAATCGGCTTCAAAGGCCAAGAAGACCTCGGTAACGGCCTGAAAGCCATT
 TGGCAGGTTGAGCAAAAAGCATCTATCGCCGGTACTGACTCCGGTTGGGGCAACCGCCAATCCTTCATCGGCTTG
 AAAGGCGGCTTCGGTAAATTGCGCGTCCGGTCGTTTGAACAGCGTCTGAAAGACACCGGCGACATCAATCCTTGG
 GATAGCAAAAAGCGACTATTTGGGTGTAAACAAAATTGCCGAACCCGAGGCACGCCTCATTTCCGTACGCTACGAT
 TCTCCCGAATTTGCCGGCCTCAGCGGCAGCGTACAATACGCGCTTAACGACAATGCAGGCAGACATAACAGCGAA
 TCTTACCACGCCGGCTTCAACTACAAAAACGGTGGCTTCTTCGTGCAATATGGCGGTGCCATAAAAAGACATCAT
 CAAGTGCAAGAGGGCTTGAATATTGAGAAAATACCAGATTCACCGTTTGGTCAGCGGTTACGACAATGATGCCCTG
 TACGCTTCCGTAGCCGTACAGCAACAAGACGCGAAAATGACTGATGCTTCCAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAA
 GTTGGCCGTACCTTGGCATAACCGCTTCGGCAACGTAACGCCCCGAGTTTCTTACGCCACGGCTTCAAAGGTTTG
 GTT**GCTGCT**GCAGACATAGGCAAC**CG**ATACGACCAAGTGGTTGTTCGGTGCAGGAAACGACTTCTCAAACGCACT
 TCTGCCTTGGTTTCTGCCGGTTGGTTGCAAGAAGGCAAAGGCGAAAAACAAATTCGTAGCGACTGCCGGCGGTGTC
 GGTCTGCGCCACAAATTCTAA

FomA

KEVMPAPTAPKVVVEYVEKPIVYRDREVAPAWRPNGSVDVQYRWYGNVENRTPKKEDPAS PWLGDNVNAGR LQ
 TLTKNVFTEKQTL EIRTRNYHTLMNPKDSQAADDQVRVRHFYKFGKLGSSKIDVTSRLEYKKNNGDAGR KQAEAS
 VLFDFADYIYSNFFKADKFGFRLGYQHKWAGHNSGVVQPFNKGTQDNFYINF ESEYTLPWGFS AELNAYNYN
 VHNKKFATYNKGNKKSQFYGEIEAYLYQHTPLYKTNNVELSFD FEGGYDPYTW H QYKVVSAKDSNKYEVYMLPTL
 QVSYKPTDFVKLYAAAGAEYRNWAVTAESKAKNWRWQPTAWAGMKVTF

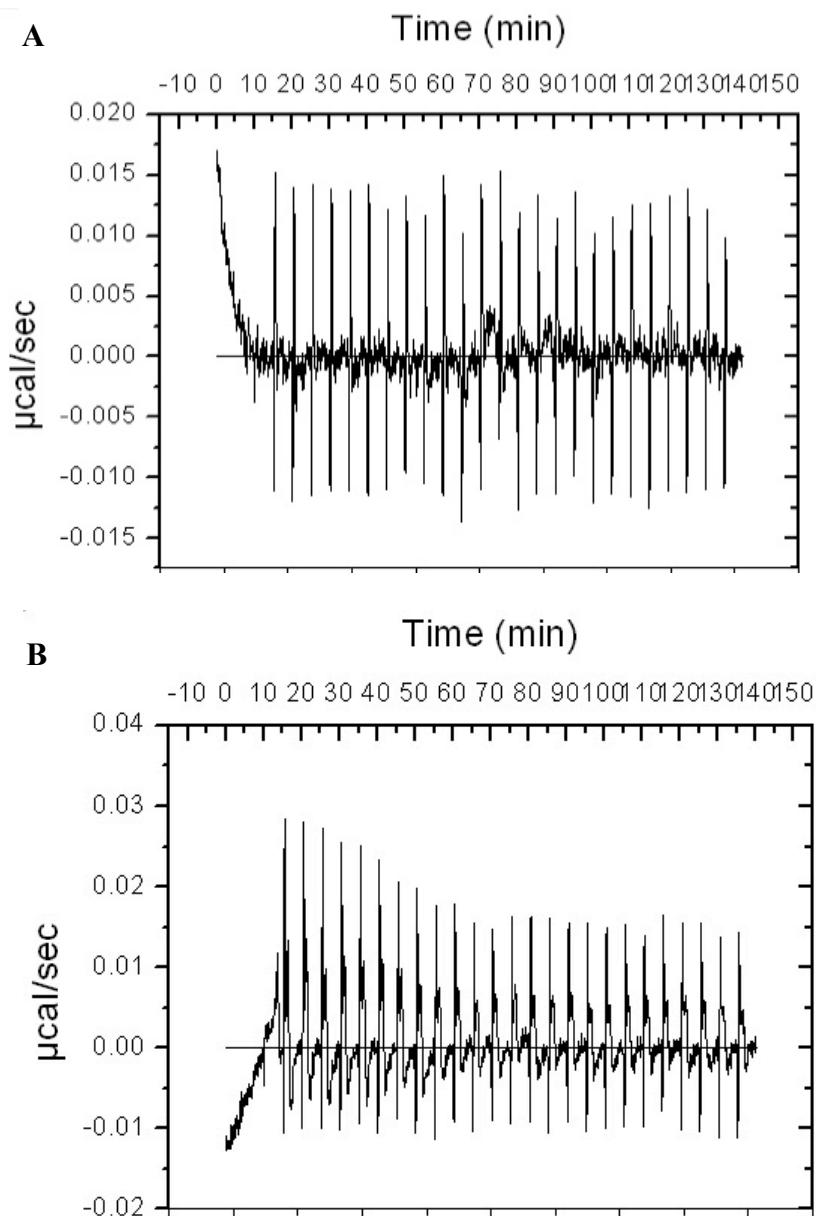
ATGAAAAAATTAGCATTAGTATTAGGTTCAATTATTAGTAGTTGGATCAGTTGCATCAGCTAAAGAAGTTATGCCT
 GCACCTACTCCAGCTCCTGAAAAAGTAGTAGAATATGTTGAAAAACCAGTTATAGTTTACAGAGACAGAGAAGTT
 GCTCCAGCTTGGAGACCAATGGTTTCAAGTAGATGTTCAATACAGATGGTATGGAGAAAGTTGAAAAGAAAAATCCA
 AAAGATGATAAAGATGAAAACCTGGGCAACTGGTAAAGTAAATGCCGGAAAGATTACAAACTTTAACAAAAGTAAAC

```

TTTACTGAAAAACAAACTTTAGAAAGTAAGAACAAGAAATCATCATACTTTAAATGATACAGATGCAAATAACAAG
AAATCAAATGGAGCAGCTGATGAATATAGATTAAGACACTTCTATAACTTTGAAAAGTTAGGTTTCATCTAAAGTT
AATGCTACTTCAAGAGTAGAATTTAAACAAAAACAAATGATGGAGAAAAATCTTTAGGAGCATCAGTATTATTT
GATTTTGCTGATTATATCTATTCTAACAATTTCTTTAAAGTTGATAAATTAGGATTAAGACCAGGATATAAATAT
GTATGGAAAGGACATGGAAATGGTGAAGAAGGAACTCCTACAGTTCATAATGAATATCATTTAGCATTTGAATCT
GATTTACATTACCATTTAACTTTGCTTTAAACTTAGAATATGATTTATCTTATAACAGATATAGAGAAAAATTC
GAAACAACAGATGGATTAAGAAAGCTGAATGGTATGGTGAATTAACAGCTGTACTTTCTAACTACACTCCATTA
TATAAAGCAGGGGCATTTGAATTAGGATTCAATGCTGAAGGTGGATATGATACTTACAATATGCACCAATATAAG
AGAATTGGTGGAGAAGATGGAACCTTCTGTTGACAGAAGAGACTATGAATTATACTTAGAACCAACTCTACAAGTT
TCTTATAAACCAACAGATTTGTAATAACTATATGCAGCAGCAGGAGCTGACTACAGAAATAGAATTACTGGAGAA
TCAGAAGTTAAGAGATGGAGATGGCAACCAACTGCTTGGGCTGGTATGAAAGTTACTTTCTAA

```

A.10: ITC-Analysen der Bindung zwischen PorB_B und sTLR2. Abgebildet ist die elektrische Ladung, die nach jeder Injektion von PorB_B zu sTLR2 gemessen wurden. Sie entspricht der aufzubringenden Leistung um eine konstante Temperatur zwischen der Referenz- und Probenzelle aufrechtzuerhalten. **(A)** Messung mit sTLR2Fc. **(B)** Messung mit MBP_sTLR2VLRB_GFP.



Danksagung

Dr. Mikio Tanabe danke ich für die gegebene Möglichkeit wie auch sein entgegengebrachtes Vertrauen diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Des Weiteren bedanke ich mich vor allem für seine ausgezeichnete Betreuung als auch seinen Optimismus während dieser Zeit, die maßgeblich zum Fortschritt dieser Arbeit geführt haben.

Bei **Dr. Ulrich Zachariae** und **Jan Zaucha (M. Sc.)** möchte ich mich für die Aufnahme der moleküldynamischen Simulationen im Rahmen unserer Kooperationen bedanken, die bedeutend zur Vervollständigung und Interpretation der Ergebnisse beigetragen haben.

Dr. Caroline Haupt und **Dr. Frank Jaenecke** danke ich für die Korrekturlesung meiner Arbeit. **Prof. Dr. Milton T. Stubbs** danke ich ebenfalls für die Korrekturlesung dieser Arbeit sowie die Übernahme des Gutachtens.

Bei **Dr. Paola Massari** bedanke ich mich für die Bereitstellung der Plasmide für PorB_B, PorB_{AKR} und FomA sowie dem gereinigten sTLR2Fc, wie auch ihrer durchgehenden Bereitschaft Fragen und Probleme zu diskutieren.

Nadine Rüppel (B. Sc.) danke ich für die praktische Unterstützung und Hilfe im Labor im Zusammenhang mit Versuchen zum PorB_{AKR}.

Frau **Dr. Angelika Schierhorn** danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen.

Der gesamten **Arbeitsgruppe ZIK HALOmem** danke ich für die große Hilfsbereitschaft im Labor, ihre Diskussionsbereitschaft und die sehr angenehme Atmosphäre während dieser Zeit.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meiner **Familie** bedanken, für ihre Geduld und Unterstützung, ohne welche diese Arbeit nicht zum jetzigen Standpunkt hätte fortgeführt werden können.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Christof Kattner
Geburtsdatum: 29.01.1983
Geburtsort: Oppeln
Familienstand: ledig, ein Kind

Hochschulausbildung

- 01/2010 - 12/2013 Promotionsstudium unter Anleitung von Dr. Mikio Tanabe in der Arbeitsgruppe ZIK HALOmem am Institut für Biochemie/Biotechnologie Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- 10/2007 – 12/2009 Studium der Biochemie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Diplom-Biochemiker
Diplomarbeit: „*Expression, Reinigung und Charakterisierung der zytoplasmatischen Membrandomäne des Toll-9 Rezeptors aus Drosophila melanogaster*“ angefertigt in der Arbeitsgruppe Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Milton Stubbs am Institut für Biochemie/Biotechnologie MLU Halle-Wittenberg.
- 10/2003 - 09/2007 Studium der Biotechnologie, Hochschule Anhalt
Abschluss: Dipl.-Ing. Biotechnologie (FH)
Diplomarbeit: „*Untersuchungen zur Astaxanthinbiosynthese in Scenedesmus sp.*“ angefertigt in der Arbeitsgruppe Induzierte Pathogenabwehr von Prof. Dr. Sabine Rosahl am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle.

Schulbildung und Zivildienst

- 07/2002-05/2003 Zivildienst im Don-Bosco Jugendheim, Nürnberg
- 1993 - 2002 Johannes-Scharrer-Gymnasium, Nürnberg
Abschluss: allgemeine Hochschulreife
- 1989 - 1993 Grundschule, Nürnberg

Publikationen

Kattner, C., Zaucha, J., Jaenecke, F., Zachariae, U. und Tanabe, M. (2013). Identification of a cation transport pathway in *Neisseria meningitidis* PorB. *Proteins* 81, 830-840.

Kattner, C. , Toussi, D.N., Zaucha, J., Wetzler, L.M., Ruppel, N., Zachariae, U., Massari, P. und Tanabe, M.(2014). Crystallographic analysis of *Neisseria meningitidis* PorB extracellular loops potentially implicated in TLR2 recognition. *Journal of Structural Biology* 185, 440-447.

Kattner, C., Pfennig, S., Massari, P. und Tanabe, M. (2015). One–Step Purification and Porin Transport Activity of the Major Outer Membrane Proteins P2 from *Haemophilus influenzae*, FomA from *Fusobacterium nucleatum* and PorB from *Neisseria meningitidis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 175, 2907-2915.

Poster

The 42nd crystallographic course: Structure and Function from Macromolecular Crystallography. Erice (Italien), 3.-13. Juni 2010.

Gordon Research Conference: Mechanisms of Membrane Transport, South Hadley (USA). 16.-21. Juni 2013.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die hier vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und mich dabei keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel und Quellen bedient habe. Darüber hinaus sind alle von weiteren Personen durchgeführte Versuche und bereitgestellte Materialien entsprechend gekennzeichnet. Die Dissertation wurde von mir noch bei keiner anderen Universität oder Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Halle im April 2015

Christof Kattner