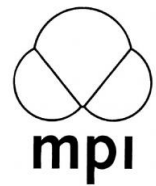


**Struktur und Funktion von TcdA1 und  
TcdB2-TccC3 eines Tc-Toxinkomplexes aus  
*Photorhabdus luminescens***



**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie  
der Technischen Universität Dortmund

angefertigt am  
Max-Planck-Institut für  
Molekulare Physiologie in Dortmund

vorgelegt von

**Dominic Meusch**



Erstgutachter

Prof. Dr. Roger S. Goody

Max-Planck-Institut für  
Molekulare Physiologie  
Abteilung für Physikalische Biochemie  
Otto-Hahn-Str. 11  
44227 Dortmund

Zweitgutachter

Prof. Dr. Roland Winter

Technische Universität Dortmund  
Fakultät Chemie und Chemische Biologie  
Physikalische Chemie I  
Otto-Hahn-Str. 6  
44227 Dortmund

Tag der Abgabe der Dissertation

30.01.2014



# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig verfasst und ohne unerlaubte Hilfe ausgeführt habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in einer ähnlichen Form bei keiner anderen Universität eingereicht. Weiterhin bestätige ich, dass ich bei keiner anderen Universität einen erfolglosen Promotionsversuch unternommen habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift



# INHALTSVERZEICHNIS

---

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
II. TABELLENVERZEICHNIS	IV
III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Mutualistischer und parasitärer Lebenszyklus von <i>Photorhabdus luminescens</i>	3
2.2 Pathogenese durch <i>Photorhabdus luminescens</i>	4
2.2.1 Umgehung der humoralen Immunabwehr in Insekten	5
2.2.2 Umgehung der zellulären Immunabwehr von Insekten	7
2.3 Molekulare Pathogenitätsmechanismen von <i>Photorhabdus luminescens</i>	7
2.3.1 Insektizide Toxine von <i>Photorhabdus luminescens</i>	7
2.3.1.1 <i>Makes caterpillars floppy</i> (Mcf)-Toxine	8
2.3.1.2 Binäre <i>Photorhabdus</i> -Toxine	9
2.3.1.3 <i>Photorhabdus Virulence Cassettes</i> (PVCs)	10
2.3.1.4 <i>Toxin complex</i> (Tc)-Toxine	11
2.4 Genetische Diversität von Tc-Toxinen	11
2.5 Proteinbiochemische Untersuchungen von Tc-Toxinen	15
2.6 Strukturbiologische Untersuchungen an Tc-Toxinen	17
2.7 Zielsetzung	21
3 MATERIALIEN	23
3.1 Geräte / Zubehör	23
3.2 Chemikalien / Lösungen	24
3.3 Pufferlösungen	25
3.4 Kitsysteme	26
3.5 Enzyme / Proteinstandards	26
3.6 Software	27
4 METHODEN	28
4.1 Proteinbiochemische & bioanalytische Methoden	28
4.1.1 Größenausschlusschromatographie	28
4.1.2 Visualisierung von denaturierten Proteinen mittels SDS-PAGE	29
4.1.3 Tryptischer In-Gel Verdau elektrophoretisch getrennter Proteine	30
4.1.4 HPLC-MS-Peptidanalyse tryptisch verdauter Proteine	30
4.1.5 HPLC-ESI-Analyse nativer und semidenaturierter Proteine	31

# INHALTSVERZEICHNIS

---

4.1.6	Proteinkonzentrationsbestimmung über UV-Absorption	31
<b>4.2</b>	<b>Strukturbiologische Methoden</b>	<b>32</b>
4.2.1	Negativkontrastierung-Transmissionselektronenmikroskopie	32
4.2.2	Proteinkristallisation	33
4.2.2.1	Proteinaufkonzentrierung	34
4.2.2.2	Kristallisation nach der Dampfdiffusionsmethode	34
4.2.2.3	Phasendiagramm & Kristallognese	35
4.2.2.4	Initiale Kristallbildung	36
4.2.2.5	Optimierung von Kristallisationsbedingungen	37
4.2.2.6	Herstellung von Schwermetall-derivatisierten Proteinkristallen	37
4.2.3	Proteinkristall-Kryokonservierung	39
4.2.4	Datenaufnahme und -prozessierung	40
4.2.4.1	Röntgenbeugungsexperimente an hausinternen Kupferdrehanoden-röntgenquellen	40
4.2.4.2	Röntgenbeugungsexperimente mittels Synchrotronstrahlung	40
4.2.4.3	Prozessierung von Röntgenbeugungsexperimenten	41
4.2.5	Strukturbestimmung	42
4.2.5.1	Phasierung von Röntgenbeugungsdatensätzen über molekularen Ersatz (MR)	42
4.2.5.2	Verbesserung der experimentellen Elektronendichtekarte ( <i>Solvent Flattening</i> und <i>NCS Averaging</i> )	43
4.2.5.3	Experimentelle Phasierung nach der <i>Single Wavelength Anomalous Dispersion</i> (SAD) Methode	44
4.2.5.4	Automatischer und manueller Modellbau sowie Modellverfeinerung	44
4.2.6	Strukturanalyse	45
4.2.6.1	Identifizierung und Zuordnung von Domänen und Strukturelementen	45
4.2.6.2	Vergleich von Domänen und Strukturelementen mit bekannten Proteinstrukturen	46
4.2.6.3	Untersuchung möglicher Interaktionsflächen von Domänen sowie von Protomeren eines Oligomers	46
4.2.6.4	Vorhersage von Kanälen und Poren auf Basis einer Proteinstruktur	47
4.2.6.5	Moleküldynamiksimulation eines Proteinmembranmodells	47
4.2.6.6	Sequenzbasierte Homologiedarstellung von Proteinstrukturen aufgrund evolutionärer Konservierung	48
4.2.6.7	Hydrophobizitätsanalyse nach Hessa & Heijne	48
4.2.6.8	Strukturbasierte Vorhersage von Protonierungszuständen bei unterschiedlichen pH-Werten	49
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE &amp; DISKUSSION</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>TcdA1-Präpore</b>	<b>51</b>
5.1.1	Kristallisation und Strukturbestimmung von TcdA1	51
5.1.2	Die TcdA1-Protomere werden über komplementäre Ladungsinteraktionsflächen zusammengehalten	55
5.1.3	Ein TcdA1-Protomer besteht aus acht Domänen	57



# INHALTSVERZEICHNIS

---

5.1.4	Die $\alpha$ -helikale Domäne der äußeren Hülle eines TcdA1-Protomers zeigt eine unbekannt Struktur mit neuer Domänenanordnung	58
5.1.5	TcdA1 besitzt in der äußeren Hülle eine neuraminidaseähnliche und vier rezeptorbindende Domänen	62
5.1.6	Die zentrale porenbildende Domäne eines Protomers bildet im TcdA1-Pentamer einen 220 Å langen Translokationskanal aus	67
5.1.7	Der Translokationskanal arbeitet kationenselektiv und zeigt eine Homologie zur Anthraxtoxinpore	72
5.1.8	Die Verknüpfersdomäne verbindet die äußere Hülle mit dem Translokationskanal in einer unnatürlichen Konformation	74
5.1.9	Eine pH-Änderung öffnet möglicherweise ein „elektrostatisches Schloss“ im neuraminidaseähnlichen Pentamer	75
<b>5.2</b>	<b>TcdB2-TccC3-Fusionsprotein</b>	<b>77</b>
5.2.1	Strukturbestimmung des TcdB2-TccC3-Fusionsproteins	77
5.2.2	Das TcdB2-TccC3-Heterodimer beschreibt ein nicht klassisches RHS-Protein	79
5.2.3	Die ADP-Ribosyltransferase C3 liegt im Kokoninnenraum von TcdB2-TccC3 in einer wahrscheinlich ungefalteten Form vor	84
5.2.4	TccC3 beherbergt eine intrinsische RHS-Aspartatprotease-Domäne	86
5.2.5	Die TcdB2-Struktur enthält eine unsymmetrische sechsblättrige $\beta$ -Propellerdomäne	89
5.2.6	Die Asymmetrie des sechsblättrigen $\beta$ -Propellers verschließt die TcA-bindende Domäne in der TcdB2-TccC3-Kristallstruktur und dadurch den Ausgang in den TcdA1-Translokationskanal	93
<b>5.3</b>	<b>Modell des Translokationsmechanismus von Tc-Toxinen</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>139</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKATIONEN &amp; KONFERENZBEITRÄGE</b>	<b>140</b>



I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Mutualistischer sowie parasitärer Lebenszyklus von *Photorhabdus luminescens* ..... 3

Abb. 2: Umgehung der humoralen und zellulären Insektenimmunabwehr durch *Photorhabdus luminescens*..... 5

Abb. 3: Domänenstruktur von Mcf1 und Mcf2 aus *Photorhabdus luminescens* ..... 8

Abb. 4: Vergleich eines Afp-Proteins mit den Bestandteilen des T6SS und Bakteriophagen-T4-Infektionsapparates ..... 10

Abb. 5: Schematische Darstellung von Tc-Toxinen innerhalb der Genloci von insektenpathogenen Prokaryonten ..... 12

Abb. 6: Schematische Darstellung von Tc-Toxinen innerhalb der Genloci von pflanzenpathogenen Prokaryonten..... 13

Abb. 7: Schematische Darstellung von Tc-Toxinen innerhalb der Genloci von humanpathogenen Prokaryonten ..... 14

Abb. 8: Darstellung der Domänenstruktur von TcdA1, TcdB2, TccC3 sowie TccC5 aus *Photorhabdus luminescens* ..... 15

Abb. 9: Modell der Komplexbildung von Tc-Toxinen ..... 16

Abb. 10: Modell der Translokation von Tc-Toxinen ..... 17

Abb. 11: Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Tc-Toxinen ..... 18

Abb. 12: Elektronenmikroskopische Struktur eines XptA1-Tetramers aus *Xenorhabdus nematophila* ..... 19

Abb. 13: Elektronenmikroskopische Struktur von YenA1/A2 aus *Yersinia entomophaga* und TcdA1 aus *Photorhabdus luminescens* ..... 20

Abb. 14: Proteinkristallisation über Dampfdiffusion ..... 35

Abb. 15: Phasendiagramm des Wachstums eines Proteinkristalls über Dampfdiffusion bei unterschiedlichen Startbedingungen ..... 36

Abb. 16: Flussdiagramm der TcdA1-Strukturbestimmung über molekularen Ersatz ..... 42

Abb. 17: Reinigung und elektronenmikroskopische Analyse von TcdA1 ..... 52

Abb. 18: Atomare Struktur des TcdA1-Pentamers..... 54

Abb. 19: Anordnung der einzelnen TcdA1-Protomere im TcdA1-Pentamer ..... 55

Abb. 20: Interaktionsfläche und Ladungsverteilung zweier Protomere in einem TcdA1-Präporen-Pentamer ..... 56

Abb. 21: Atomare Struktur eines TcdA1-Präporen-Protomers..... 57

Abb. 22: Struktur der äußeren Hülle sowie Domänenanordnung in einem TcdA1-Präporen-Protomer ..... 59

Abb. 23: Atomare Struktur und schematischer Aufbau des molekularen Proteinknotens in der kleinen Untereinheit der  $\alpha$ -helikalen Domäne von TcdA1 ..... 61

Abb. 24: Topologie und Homologie einzelner TcdA1-Domänen..... 63

---

Abb. 25: Interaktion von rezeptorbindender Domäne IV in Protomer A mit der rezeptorbindenden Domäne I in Protomer B .....	65
Abb. 26: Aufbau des TcdA1-Translokationskanals .....	67
Abb. 27: Selektivität und Durchmesser des TcdA1-Translokationskanals.....	68
Abb. 28: Konservierungsgrad und Interaktionsfläche von Aminosäuren zweier benachbarter porenbildender Domänen in einem TcdA1-Pentamer .....	69
Abb. 29: Simulation der TcdA1-Transmembranregion in einer künstlichen DOPC-Membran ....	70
Abb. 30: Konservierung, Hydrophobizität und elektrostatisches Potential des TcdA1-Translokationskanals .....	73
Abb. 31: Konservierungsgrad und Interaktionsfläche von Aminosäuren einer Verknüpf-Domäne mit Aminosäuren benachbarter TcdA1-Präporenprotomere .....	74
Abb. 32: pH-abhängige Ladungsänderungen im Neuraminidase-ähnlichen Pentamer der TcdA1-Präpore .....	76
Abb. 33: Reinigung und elektronenmikroskopische Analyse von TcdB2-TccC3 .....	78
Abb. 34: Atomare Struktur des TcdB2-TccC3 Heterodimers .....	80
Abb. 35: Physikalische Eigenschaften der Interaktionsfläche zwischen TcdB2 und TccC3 .....	81
Abb. 36: Verteilung von hydrophoben und geladenen Aminosäuren in jeweils drei RHS-Repeat-Motiven bei TccC3 .....	82
Abb. 37: Physikalische Eigenschaften des Kokoninnenraums von TcdB2-TccC3 .....	83
Abb. 38: Nachweis der ADP-Ribosyltransferase C3 im Kokon der Kristallstruktur von TcdB2-TccC3 .....	85
Abb. 39: TccC3 beherbergt eine intrinsische RHS-Aspartatproteasedomäne .....	87
Abb. 40: Konservierung von RHS-Aspartatprotease-Domänen.....	88
Abb. 41: Struktur der N-terminalen Region sowie der TcA-bindenden Domäne in TcdB2 .....	89
Abb. 42: Analyse von Strukturhomologen der TcA-bindenden Domäne .....	90
Abb. 43: Die TcA-bindende Domäne hat die Struktur eines unsymmetrischen sechsblättrigen $\beta$ -Propellers.....	91
Abb. 44: Der $\beta$ -Propeller in der TcdB2-Struktur hält den TcdB2-TccC3-Kokon verschlossen....	93
Abb. 45: Hydrophobizitätsanalyse des $\beta$ -Propellerinnenraums in der TcA-bindenden Domäne	95
Abb. 46: Möglicher dualer Mechanismus der Komplexbildung, der Rezeptorbindung und der Porenbildung bei Tc-Toxinen von <i>Photobacterium luminescens</i> während der Infektion von Darmepithelzellen .....	98
Abb. 47: Kristallisation von TcdA1 in unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen.....	113
Abb. 48: Optimierte Röntgenbeugungsexperimente an A-, B- und C-Kristallen von TcdA1 .....	114
Abb. 49: Seiten- und Frontansicht der TcdA1-Einheitszelle von A-, B- und C-Kristallen.....	115
Abb. 50: Experimentelle und verfeinerte Elektronendichtekarte der A-Kristalle von TcdA1 .....	116
Abb. 51: B-Faktorverteilung in einem TcdA1-Präporen-Protomer .....	118

---

Abb. 52: Modell der Konservierung eines TcdA1-Präporen-Protomers .....	119
Abb. 53: Konservierungsgrad und Interaktionsfläche von Aminosäuren einer porenbildenden Domäne mit benachbarten TcdA1-Präpore-Protomeren .....	120
Abb. 54: Kristallisation von TcdB2-TccC3 in zwei Kristallisationsbedingungen .....	125
Abb. 55: Röntgenbeugungsexperimente an TcdB2-TccC3-Kristallen .....	126
Abb. 56: Ausmaße der Einheitszelle in einem TcdB2-TccC3-Kristall .....	127
Abb. 57: Experimentelle und verfeinerte Elektronendichtekarte eines TcdB2-TccC3-Kristalls.	128
Abb. 58: Vorkommen von klassischen YD-Repeats in RhsA aus <i>Escherichia coli</i> .....	130
Abb. 59: Vorkommen von klassischen und nicht-klassischen YD-Repeats in TcdB2 und TccC3 aus <i>Photobacterium luminescens</i> .....	131
Abb. 60: <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Nachweis der intrinsischen Aspartatprotease-Aktivität im Kokoninnenraum des TcdB2-TccC3-Heterodimers .....	132
Abb. 61: Vergleich der TcA-bindenden Domäne mit homologen Strukturen .....	133
Abb. 62: Sequenzvergleich der TcA-bindenden Domäne aus TcdB2 mit Domänen homologer B-Komponenten .....	134
Abb. 63: Vergleich der TcdB2-TccC3-Struktur aus <i>P. luminescens</i> mit der YenB-YenC2-Struktur aus <i>Y. entomophaga</i> .....	135
Abb. 64: Vergleich der RHS-Aspartatprotease-Domäne von TccC3 mit YenC2 .....	136
Abb. 65: Vergleich der TcB N-terminalen Region von TcdB2 mit YenB .....	136
Abb. 66: B-Faktorverteilung in einem TcdB2-TccC3-Heterodimer.....	137

---

## II. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Geräte / Zubehör .....	23
Tab. 2: Chemikalien / Lösungen .....	24
Tab. 3: Pufferlösungen.....	25
Tab. 4: Kitsysteme .....	26
Tab. 5: Enzyme / Proteinstandards.....	26
Tab. 6: Software.....	27
Tab. 7: Schwermetallverbindung für die Schwermetallderivatisierung von TcdB2-TccC3-Kristallen .....	38
Tab. 8: Kristallographische Zusammenfassung der Röntgen-beugungsexperimente von A-, B- und C-Kristallen des TcdA1-Pentamers .....	117
Tab. 9: Vorkommen von TcdA1-Präporen-Domänen in homologen A-Komponenten insektpathogener Prokaryonten.....	121
Tab. 10: Vorkommen von TcdA1-Präporen-Domänen in homologen A-Komponenten pflanzen- und humanpathogener Prokaryonten .....	122
Tab. 11: Interaktionsflächen in Protomeren, Kanal, Hülle und Domänen einer TcdA1-Präpore .....	123
Tab. 12: Interaktionsfläche einer Poren-bildenden mit benachbarten Poren-bildenden Domänen in einem TcdA1-Translokationskanal.....	124
Tab. 13: Interaktionsfläche einer poren-bildenden Domäne mit benachbarten Domänen der äußeren Hülle .....	124
Tab. 14: Interaktionsfläche einer Verknüpfedomäne mit benachbarten Domänen aller Protomere .....	124
Tab. 15: Kristallographische Zusammenfassung der Röntgenbeugungsexperimente Schwermetall-derivatisierter TcdB2-TccC3-Kristalle .....	129
Tab. 16: Interaktionsfläche von TcdB2 mit TccC3 sowie des Kokons und $\beta$ -Propellers von TcdB2 .....	130
Tab. 17: Vorkommen von A-, B- und C-Komponenten in insekten-, pflanzen- und humanpathogenen Prokaryonten .....	138

### III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
%	Prozent
α	Alpha
A	Alanin
Å	Angström
AB	Antibiotika
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Antimikrobielles Peptid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Asymmetrische Einheit
β	Beta
bzw.	Beziehungsweise
C	Cystein
ca.	Circa
chi	Chitinase
CMG2	<i>Capillary morphogenesis protein 2</i>
Cry	<i>Crystal</i>
D	Asparaginsäure (Aspartat)
Da / kDa / MDa	Dalton / Kilodalton / Megadalton
DEN	<i>Deformable Elastic Network</i>
d.h.	Das heißt
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycerol-3-Phosphatidylcholin
DTT	Dithiothreitol
DM	Dichtemodifikation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Glutaminsäure (Glutamat)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure



---

EF	<i>Edema factor</i>
EMD	<i>Electron microscopy databank</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Phenylalanin
g / kg / mg / µg / ng / pg	Gramm / Kilogramm / Milligramm / Mikrogramm / Nanogramm / Pikogramm
G	Glycin
GDP	Guanosindiphosphat
GF	<i>Gel filtration</i>
GTP	Guanosintriphosphat
H <sup>+</sup>	Wasserstoffkation
HAIP	<i>Hemocyte aggregation inhibitor protein</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HLH	<i>Helix-loop-helix</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I	Isoleucin
ID	Identifikationsnummer
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IFN	Interferon
IL	Interleukin
K	Lysin
kcal	Kilokalorie
L	Leucin
L / mL / µL / nL	Liter / Milliliter / Mikroliter / Nanoliter
LF	<i>Lethal factor</i>
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
m / cm / mm / µm / nm	Meter / Zentimeter / Millimeter / Mikrometer / Nanometer
M	Methionin





---

M / mM / $\mu$ M / nM / pM	Molar / Millimeter / Mikrometer / Nanometer / Pikometer
mA	Milliampere
mAU	Milliabsorptionseinheit
Mcf	<i>Makes caterpillars floppy</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
Min.	Minute
MR	Molekularer Ersatz
MS	Massenspektrometrie
N	Asparagin
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NCS	Nichtkristallographische Symmetrie
OH <sup>-</sup>	Hydroxidation
orf	<i>Open reading frame</i>
P	Prolin
PA	<i>Protective antigen</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pdb	Proteindatenbank
PGRP	<i>peptidoglycan recognition protein</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Php	<i>Photorhabdus protease</i>
Pir	<i>Photorhabdus insect-related</i>
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PO	Phenoloxidase
PPO	Prophenoloxidase
PVC	<i>Photorhabdus virulence cassettes</i>
Q	Glutamin
R	Arginin
Rho	<i>Ras homologue</i>



---

RHS	<i>Rearrangement hot spot</i>
RMSD	Mittlere quadratische Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SAD	<i>Single-wavelength Anomalous Dispersion</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
T	Threonin
T3SS/T6SS	Typ-3/6-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
Tc	<i>Toxin complex</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
V	Valin
V / kV / mV	Volt / Kilovolt / Millivolt
vs.	Versus
W	Tryptophan
Xax	<i>Xenorhabdus alpha-xenorhabdolysin</i>
z.B.	Zum Beispiel



## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Bakterium *Photorhabdus luminescens* lebt in einer mutualistischen Symbiose mit Nematoden der Gattung *Heterorhabditis*. Die Nematoden dringen in das Hämözöl und den Gastrointestinaltrakt verschiedener Insektenarten ein und sondern dort über ihre Körperausgänge die Bakterien ab. Um die Immunabwehr des Insekts zu umgehen und das Insekt zu töten, sekretiert *Photorhabdus luminescens* eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, insbesondere Tc-Toxine. Tc-Toxine sind aus jeweils einer A-, B- und C-Komponente aufgebaut, die einen 1,7 Megadalton großen Holotoxinkomplex bilden. Dieser Komplex enthält ein toxisches Enzym, das nach Übertragung in die Wirtszelle durch Modifikation von Proteinen zum Zelltod führt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die dreidimensionalen Strukturen der pentameren A-Komponente (TcdA1-Präpore aus *Photorhabdus luminescens*) und des Heterodimers der B- und C-Komponente (TcdB2-TccC3 aus *Photorhabdus luminescens*) mittels Röntgenkristallographie bestimmt. Das TcdB2-TccC3-Heterodimer bildet eine kokonähnliche Struktur und enthält im C-terminalen Bereich von TccC3 eine intrinsische Aspartatproteasedomäne. Diese Domäne spaltet den C-Terminus von TccC3 ab, der als ADP-Ribosyltransferase C3 die eigentlich toxische Komponente bildet, die wahrscheinlich in einem entfalteten Zustand im Kokon vorliegt. Desweiteren verschließt ein unsymmetrischer  $\beta$ -Propeller den Kokon in TcdB2.

Die TcdA1-Struktur zeigt ein Pentamer, das aus einer äußeren Hülle und einem zentralen Translokationskanal aufgebaut ist. Die äußere Hülle enthält Insertionen, die sich in rezeptorbindende Domänen und in ein neuraminidaseähnliches Pentamer falten. Aufgrund der Homologie zu Sialidasen könnte dieses Pentamer Glykoproteine in der Wirtszelle enzymatisch spalten. Die rezeptorbindenden Domänen zeigen Homologien zu Interleukin- und Interferon-Rezeptoruntereinheiten. Durch Interaktionen mit Mitgliedern dieser Zytokinrezeptorfamilie könnte das TcdA1-Pentamer an der Wirtszellmembran stabilisiert und die Penetration der Membran durch den TcdA1-Translokationskanal bei einer Konformationsänderung unterstützt werden



## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Mutualistischer und parasitärer Lebenszyklus von *Photorhabdus luminescens*

Nematoden der Gattung *Heterorhabditis* bzw. *Steinernema* treten meist in bodennahen Habitaten des Erdreichs auf und befallen obligat Insekten bzw. Insektenlarven als Endoparasit (Kaya, 1978). Über Bodenvibrationen oder chemische Lockstoffe, wie zum Beispiel Kohlenstoffdioxid, finden sie ihren Wirt (Torr et al., 2004; Hallem et al., 2011) und gelangen in diesen über Penetration der Haut oder über Körperöffnungen wie Mund, Tracheen oder Anus (Bedding und Molyneux, 1982). Von dort aus wandern sie in das Hämözöl des Insekts.

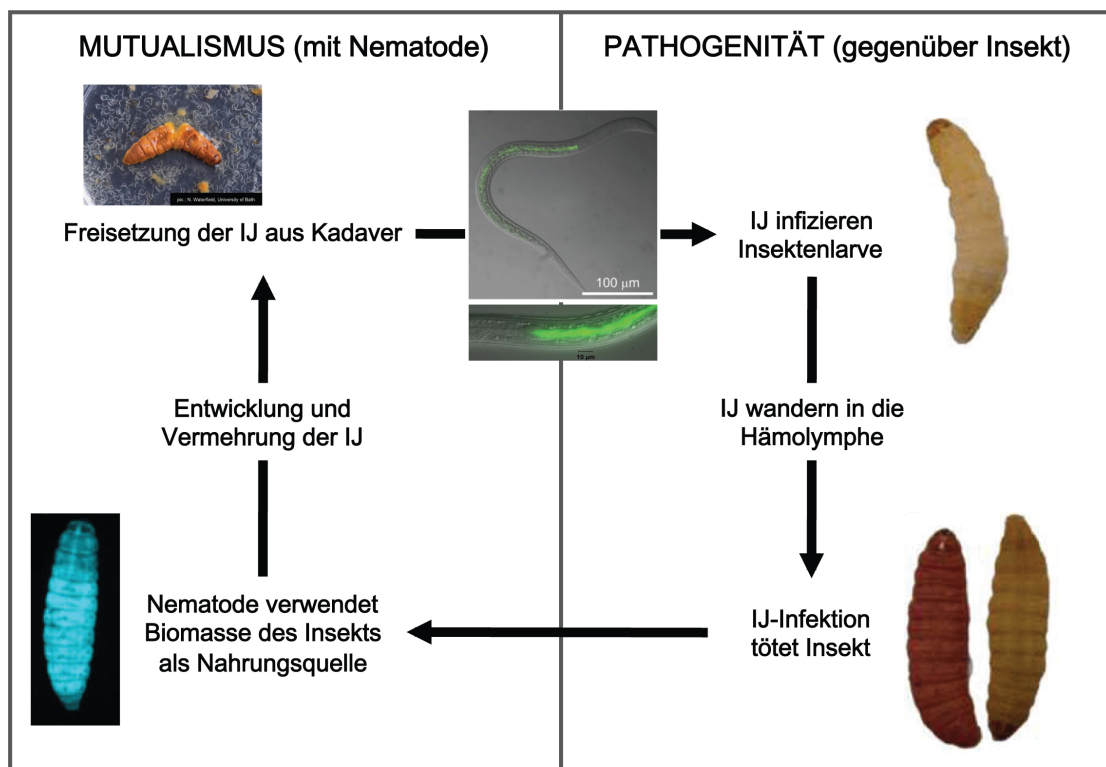


Abb. 1: Mutualistischer sowie parasitärer Lebenszyklus von *Photorhabdus luminescens*

*Photorhabdus luminescens* lebt in einer mutualistischen Beziehung als Endosymbiont in Nematoden, die in Insekten leben. In einer bestimmten Entwicklungsstufe des Jugendstadiums wandern infektiöse Nematoden (IJ) in die Hämolymphe von Insektenlarven und setzen *Photorhabdus luminescens* frei, die das Insekt schließlich töten. Die Bakterien sowie die Nematoden verwenden die Biomasse des Insekts als Nahrungsquelle bis weiterentwickelte infektiöse Nematoden neue Insektenlarven befallen können. Die Abb. wurde nach (Goodrich-Blair et al., 2007) modifiziert.

---

*Heterorhabditis*-Arten leben in einer mutualistischen Symbiose mit Prokaryonten der Gattung *Photorhabdus* (Abb.1) (Kaya und Gaugler, 1993). *Photorhabdus*-Arten leben im Darm der Nematoden und zeigen ab einer physiologisch-relevanten Bakteriendichte die Biolumineszenz als Charakteristikum, die auf die *Photorhabdus*-eigene Luciferaseaktivität zurückgeführt wird (Abb. 1 mittig oben) (Schmidt et al., 1989).

*Photorhabdus luminescens* ist das am genauesten untersuchte Bakterium der Gattung *Photorhabdus*. Es lebt in einer mutualistischen Symbiose mit *Heterorhabditis bacteriophora* und wird ab einem bestimmten infektiösen Stadium (IJ) vom Nematoden in das Insektenhämozöl abgegeben (Forst et al., 1997). Für diesen Mechanismus ist ein vom Insekt produzierter Faktor verantwortlich, der ursprünglich als evolutionärer Schutz gegen eine Infektion diente (Ciche und Ensign, 2003).

Auf diesem Wege in das Insektenhämozöl gelangte *Photorhabdus luminescens* zeigt in Bezug auf den neuen Wirt ein parasitäres Verhalten (Abb. 1). Somvanshi et al. vermuten, dass diese Verhaltensänderung durch eine einzelne Inversion eines stochastischen Promotors hervorgerufen wird, wodurch kleinere avirulente zu größeren virulenten Prokaryontenzellen heranwachsen (Somvanshi et al., 2012). Zusätzlich wird die Sekretion einer Vielzahl von Toxinen induziert, die zum schnellen Tod des Insekts führen (Bowen und Ensign, 1998; French-Constant und Bowen, 1999).

## 2.2 Pathogenese durch *Photorhabdus luminescens*

Die Infektion eines Insekts durch *Heterorhabditis bacteriophora* und *Photorhabdus luminescens* führt zur sofortigen Aktivierung der humoralen Immunabwehr. Hierbei reicht die Anwesenheit von *Photorhabdus luminescens* aus und führt zur Ausschüttung von Wirtszellfaktoren, die an Membranproteine der Insektenzelloberfläche wie Hämolin, C-Typ-Lektinrezeptoren und *peptidoglycan recognition proteins* binden (Sun et al., 1990; Tian et al., 2009; Kurata, 2014). Die dadurch aktivierte humorale Immunabwehr führt zur Produktion und Sekretion antimikrobieller Peptide wie Lysozym oder Attakin (Abb. 2), die zur Suppression des Bakterienwachstums in der Hämolymphe führen (Dickinson et al., 1988; Mulnix et al., 1994). Gleichzeitig wird eine Melaninisierung der Hämolymphe durch proteolytische Spaltung von Prophenoloxidase in aktivierte Phenoloxidase eingeleitet, die mit einer sichtbaren Verdunkelung der Insektenlarven einhergeht (Abb. 1, unten rechts) (Gillespie et al., 1997). Immunmodulatoren der Familie der

Icosanoide stimulieren die zelluläre Immunabwehr durch Aktivierung der Phagozytose in Hämocyten zur Eliminierung von Bakterienaggregaten (Lavine und Strand, 2002; Zhao et al., 2007).

Allerdings wird die auf diesem Wege aktivierte humorale und zelluläre Immunabwehr durch die Freisetzung unterschiedlichster Faktoren in *Photobhabdus luminescens* supprimiert. Diese Faktoren sowie deren zugrundeliegenden Mechanismen werden in den Folgeabschnitten genauer charakterisiert.

### 2.2.1 Umgehung der humoralen Immunabwehr in Insekten

Die ersten Schritte der humoralen Immunabwehr beinhalten die Produktion einer Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden. *P. luminescens* sekretiert in diesem Stadium mindestens vier

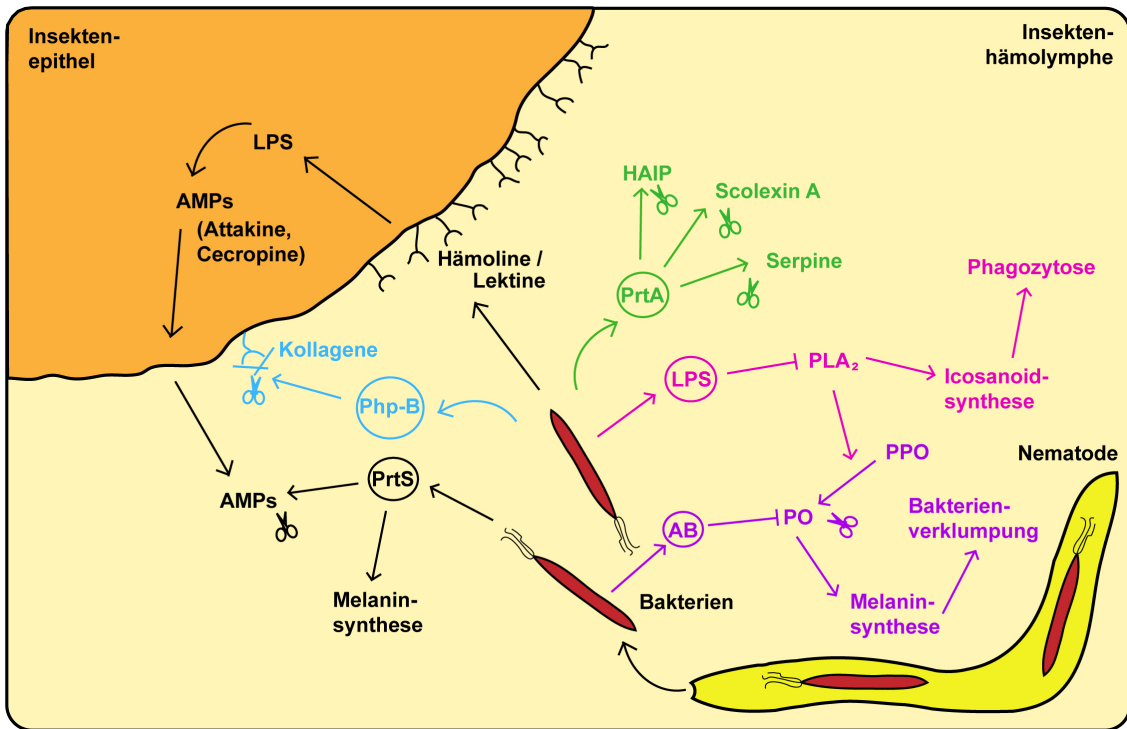


Abb. 2: Umgehung der humoralen und zellulären Insektenimmunabwehr durch *Photobhabdus luminescens*

Das Schema zeigt die Umgehung der humoralen und zellulären Immunabwehr in Insekten. Hierbei initiieren die *Photobhabdus*-eigenen Proteasen PrtA (grün), Php-B (blau) und PrtS (schwarz) den Abbau wirtseigener Proteine, wohingegen eine Ausschüttung von LPS (pink) die Ausbildung phagozytierender Hämocyten supprimiert und eine Sekretion von Antibiotika (AB, violett) eine Melaninisierung der Hämolymphe und Koagulation von Bakterienaggregaten verhindert.

Proteasen in die Hämolymphe, die die Hydrolyse von Wirtsproteinen mit einer immunabwehrähnlichen Funktion einleiten (Marokhazi et al., 2004). Ein Beispiel ist die

---

serralysinähnliche Metalloprotease PrtA aus *P. luminescens* (Abb. 2, grüner Pfad). Diese spaltet verschiedene Proteine, die eine Rolle bei der Immunerkennung ( $\beta$ -1,3 glucan recognition protein 2), der Aggregation von Hämocyten (*hemocyte aggregation inhibitor protein*), der Immunregulation und der Immunsignalweitergabe (Serpine-1) spielen, sowie als Effektoren bei Koagulationen (Scolexin A/B) fungieren (Felföldi et al., 2009). Desweiteren wird auch die Metalloprotease *Photorhabdus protease B* von *P. luminescens* sekretiert, die kurze kollagenähnliche Sequenzwiederholungen sowie Bradykinin hydrolysiert (Abb. 2, blauer Pfad). Die entstehenden Spaltprodukte dienen der Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes von *P. luminescens*. Zudem schädigt die über Php-B-vermittelte Spaltung der Kollagenfibrillen die extrazelluläre Matrix der Wirtszelle (Marokhazi et al., 2004). Schließlich werden weitere Proteasen im Rahmen einer Infektion von Insekten durch *P. luminescens* exprimiert, die im Zusammenhang mit der Umgehung der humoralen Immunabwehr stehen (Massaoud et al., 2010).

Die Melaninisierung der Hämolymphe beschreibt einen weiteren humoralen Abwehrmechanismus von Insekten. Normalerweise wird die Melaninisierung durch eine *Photorhabdus*-Infektion unterdrückt (French-Constant et al., 2003). Jedoch sekretiert *Photorhabdus* die *Photorhabdus*-spezifische Protease PrtS (Abb. 2, schwarzer Pfad), die die Melaninsynthese beschleunigt (Held et al., 2007). Eine weitere wichtige Funktion von PrtS ist die Spaltung von antimikrobiellen Peptiden, um die Insektenimmunabwehr zu hemmen (Cabral et al., 2004; Held et al., 2007). In Kombination mit einer Melaninisierung könnte *P. luminescens* das Insektenimmunsystem überreizen, damit eine Umgehung der Immunabwehr möglich ist (Held et al., 2007).

Auf molekularer Ebene wird die Melaninsynthese durch Hemmung von Phospholipase A<sub>2</sub> supprimiert, die die Spaltung von Prophenoloxidase zu Phenoloxidase eigentlich beschleunigt (Kim et al., 2005). Eine Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub> wird wahrscheinlich über die Ausschüttung von LPS (Abb. 2, pinker Pfad) durch *P. luminescens* initiiert (Dunphy, 1994). Zusätzlich kann *Photorhabdus luminescens* durch die Synthese von Antibiotika die Aktivität der Phenoloxidase inhibieren (Abb. 2, violetter Pfad) und dadurch eine bakterielle Verklumpung aufgrund einer Melaninisierung verhindern (Eleftherianos et al., 2007).



### 2.2.2 Umgehung der zellulären Immunabwehr von Insekten

Die Hemmung von PLA<sub>2</sub> führt neben einer Suppression der Melaninsynthese auch zu einer verringerten Produktion von Icosanoiden (Park et al., 2003). Die daraus resultierende Hemmung der Ausbildung von phagozytierenden Hämozyten (Abb. 2, pinker Pfad) beschreibt eine indirekte Unterdrückung der zellulären Immunabwehr in Insekten durch *P. luminescens* (Park et al., 2004).

Eine direkte Unterdrückung der Phagozytose erfolgt bei *P. luminescens* über Sekretion von Effektorproteinen in Hämozyten durch ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) (Brugirard-Ricaud, et al., 2004). Das Effektorprotein LopT aus *P. luminescens* ist homolog zu YopT aus *Yersinia pseudotuberculosis*, das als Cysteinprotease kleine GTPasen wie RhoA an der Zellmembran spaltet. Lokalisierungsexperimente bestätigten eine Rolle von LopT in der Unterdrückung des phagozytären Verhaltens von Hämozyten. Dabei zeigte sich, dass die Spaltung von RhoA nur an Zellmembranen stattfindet, die sich in direkter Nähe von Infektionsherden während einer *Photorhabdus*-Infektion befinden (Brugirard-Ricaud et al., 2005).

## 2.3 Molekulare Pathogenitätsmechanismen von *Photorhabdus luminescens*

*P. luminescens* produziert nicht nur Virulenzfaktoren für die Suppression der humoralen und zellulären Immunabwehr von Insekten, sondern auch insektizide Toxine, die nach Sekretion extrazellulär die Wirtszelle angreifen oder direkt mittels verschiedener Sekretionssysteme in die Zelle übertragen werden (Bowen et al., 1998; Rodou et al., 2010).

### 2.3.1 Insektizide Toxine von *Photorhabdus luminescens*

Insektizide Toxine aus *P. luminescens* wirken *in vivo* auf eine Vielzahl von Insekten sowie auf mehrere Säugetierzelllinien toxisch und scheinen aufgrund dieser Kreuztoxizität für den Einsatz als spezifische Bioinsektizide ungeeignet zu sein. Jedoch ändert sich die unspezifische Wirkung der Toxine durch die spezifische Wirt-Symbiont-Beziehung. Das Insekt wird nur dann von den Toxinen getötet, wenn *P. luminescens* von *Heterorhabditis indica* in das Insektenhämozöl entlassen wird (Chattopadhyay et al., 2004).

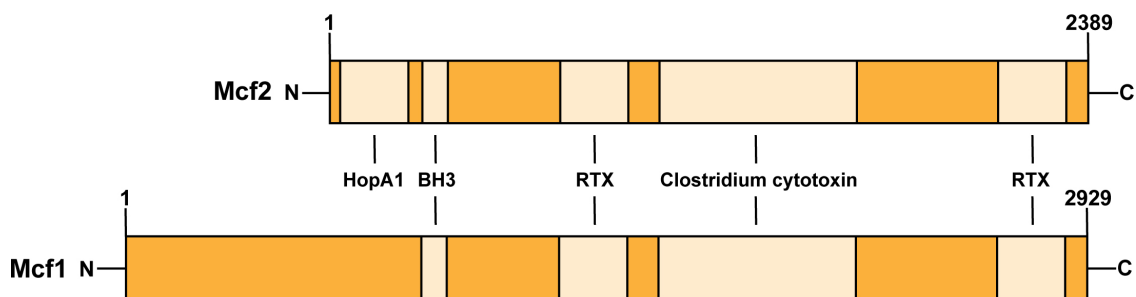
Die ersten insektiziden Toxine aus *P. luminescens* wurden von Blackburn et al. 1998 isoliert (Blackburn et al., 1998). Die Entdeckung weiterer insektizider Toxine führte zu ihrer

Klassifizierung in vier Gruppen: *Makes caterpillars floppy* (Mcf) Toxine, binäre *Photorhabdus*-Toxine, *Photorhabdus Virulence Cassettes* (PVCs) sowie *Toxin complex* (Tc) Toxine (Bowen et al., 1998; Daborn et al., 2002; Waterfield et al., 2005; Yang et al., 2006).

**2.3.1.1 *Makes caterpillars floppy* (Mcf)-Toxine**

Mcf-Toxine sind 250 kDa bis 350 kDa große Proteine. Ihr Name ist aus einer Veränderung des Phänotyps von Insektenlarven nach einer Infektion mit *Escherichia coli* und einem Cosmid mit insertiertem *mcf* Gen entstanden. Die infizierten Insektenlarven starben nach kurzer Zeit und zeigten aufgrund fehlender Körperspannung phänotypisch einen „schlaffen“ Körper (*floppy*) (Daborn et al., 2002).

*P. luminescens* enthält zwei Gene, welche für Mcf1 und Mcf2 kodieren (Abb.3). Hingegen besitzt die verwandte insekten- und humanpathogene Art *Photorhabdus asymbiotica* nur ein *mcf1* Gen (Wilkinson et al., 2009). Im Gegensatz dazu kodiert ein *hopA1* Gen aus dem pflanzenpathogenen *Pseudomonas syringae* für ein Mcf2-Homolog. Diese Beispiele bekräftigen die Diversität des Vorkommens des *mcf* Gens in verschiedenen Bakterienarten (Waterfield et al., 2003).



**Abb. 3: Domänenstruktur von Mcf1 und Mcf2 aus *Photorhabdus luminescens***

Darstellung des Domänenaufbaus von Mcf1 und Mcf2 aus *Photorhabdus luminescens*. Beide Toxine enthalten eine BH3-, eine *Clostridium difficile*- sowie zwei RTX-Toxin-ähnliche Domänen. Zusätzlich ist in Mcf2 eine HopA1-ähnliche Domäne konserviert. Die Abbildung wurde nach Hinchliffe et al. 2010 modifiziert.

Sequenzvergleiche sowie weiterführende Experimente identifizierten eine BH3-ähnliche Domäne in Mcf1 und Mcf2 (Abb.3), die für die Induktion von Apoptose in Insekten- und Säugerzellen verantwortlich ist (Dowling et al., 2004). In der Wirtszelle induziert Mcf1 den mitochondrialen Apoptoseweg, indem es direkt an die BH3-Dimerisierungsdomäne des proapoptotischen Faktors Bax bindet, dadurch die Ausschüttung von Cytochrom c begünstigt und den Abbau von Mitochondrien initiiert (Wie et al., 2001; Dowling et al., 2007). In Mcf1 und

---

Mcf2 wurden neben einer BH3-ähnlichen Domäne zusätzlich eine HopA1-ähnliche Domäne sowie zwei RTX-Toxin-ähnliche Domänen und ein hydrophober Bereich durch Sequenzvergleiche gefunden, die homolog zu möglichen Membrantranslokationsbereichen von Toxin A und B aus *Clostridium difficile* sind (Abb. 3) (Hofmann et al., 1997; Dowling et al., 2004). Die Kombination einer proapoptotisch-wirkenden BH3-Domäne mit einem hydrophoben *Clostridium difficile*-ähnlichen Membrantranslokationsbereich ist einzigartig in dieser Toxinfamilie und macht Mcf1 und Mcf2 zu hochpotenten Bioinsektizid-Kandidaten (French-Constant et al., 2007).

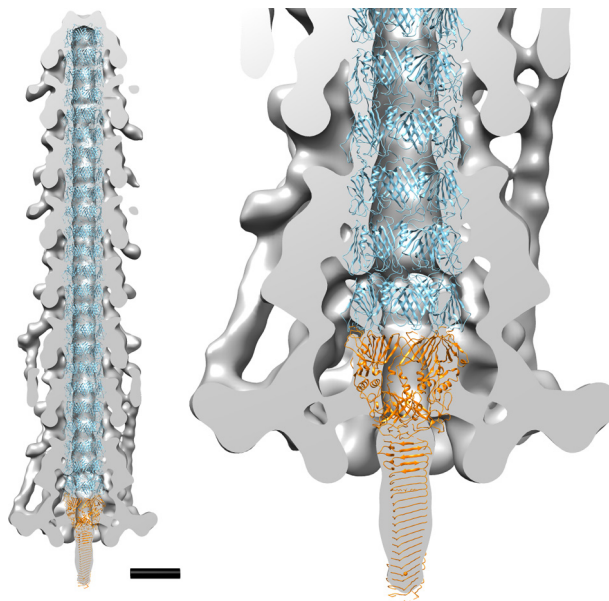
### 2.3.1.2 Binäre *Photorhabdus*-Toxine

*P. luminescens* enthält Gene, die für zwei Arten von binären Toxinen kodieren. *Photorhabdus insect-related* (Pir) Toxine bilden einen PirAB binären Toxinkomplex, der homolog zu  $\delta$ -Endotoxinen, speziell zu einer N-terminal gelegenen porenbildenden Domäne in Cry2A aus *Bacillus thuringiensis* ist (Rodou et al., 2010). PirAB-Toxinkomplexe zeigen nur Toxizität gegenüber einer bestimmten Art an Insektenlarven und zusätzlich eine orale Toxizität gegenüber den Mosquitoarten *Aedes aegypti* und *Anopheles gambiae* (Duchaud et al., 2003; Waterfield et al., 2005; Ahantarig et al., 2009). Dadurch könnte PirAB nicht nur zu einem möglichen Bioinsektizid-Ersatz für *Bacillus thuringiensis* Toxine (Bt) werden, sondern auch als Bioinsektizid für den Einsatz gegen Mosquitos und die damit verbundenen übertragbaren Krankheitserregern eingesetzt werden (French-Constant et al., 2007; Hinchliffe et al., 2010; Rodou et al., 2010).

*Xenorhabdus alpha-xenorhabdolysin* (Xax)-Toxine wurden in *Xenorhabdus*-Arten entdeckt und haben eine toxische Wirkung nur auf Insektenhämozyten und murine Erythrozyten (Ribeiro et al., 2003). Sie kodieren wie auch PirAB für binäre XaxAB-Toxinkomplexe und sind homolog zu binären Toxinen aus den Insektpathogenen *P. luminescens* und *Pseudomonas entomophila*, dem Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* und den Humanpathogenen *Proteus mirabilis* und *Yersinia enterocolitica* (Vigneux et al., 2007). In weiterführenden Experimenten konnte zusätzlich eine insektizide Aktivität von XaxAB-Homologen aus *Photorhabdus luminescens* identifiziert werden. Jedoch ist eine genaue Funktion von XaxAB-Toxinen im Infektionszyklus von *P. luminescens* noch nicht genau erforscht (Zhang et al., 2013).

### 2.3.1.3 *Photorhabdus Virulence Cassettes* (PVCs)

Eine weitere Gruppe von Toxinen aus *P. luminescens* wird als *Photorhabdus Virulence Cassettes* (PVCs) bezeichnet und zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu *Antifeeding prophage* (Afp) Proteinen aus *Serratia entomophila* (Hurst et al., 2004; Yang et al., 2006). Im Gegensatz zu PVCs, die auf einem Genom kodiert werden, sind Afp-Proteine aus *Serratia entomophila* auf einem Plasmid (pADAP) lokalisiert. Afp-Proteine übertragen in die Wirtszelle Effektorproteine, die Ähnlichkeit zu LopT, *Cycle inhibiting factor* (Cif), einzelnen Domänen des *Cytotoxic Necrotizing Factor* (CNF) und Mcf aus *P. luminescens* haben (Hurst et al., 2004; Hurst et al., 2007).



**Abb. 4: Vergleich eines Afp-Proteins mit den Bestandteilen des T6SS und Bakteriophagen-T4-Infektionsapparates**

In die Elektronendichtemappe eines Afp-Proteins aus *Serratia entomophila* (grau, EM-Datenbanknummer EMD-2419) wurden 24 Hcp1-Hexamere (hellblau, PDB-Identifikationsnummer 1Y12) des T6SS aus *Pseudomonas aeruginosa* und eine Domäne (orange, PDB-Identifikationsnummer 1K28) des Bakteriophagen-T4-Infektionsapparates eingepasst. Die Maßstabskala beträgt 10 nm. Die Abbildung wurde aus Rybakova et al., 2013 entnommen.

Interessanterweise haben PVCs und Afp-Proteine eine hohe Homologie zu Bakteriophagenproteinen sowie zu Proteinen des Typ-VI-Sekretionssystems (T6SS) (Ffrench-Constant et al., 2007). Vergleiche von elektronenmikroskopischen Strukturen zeigen strukturelle Homologien eines Afp-Proteins mit einem Hcp1-Hexamer des T6SS aus *Pseudomonas aeruginosa* sowie mit einem Bakteriophagen-T4-Injektionsapparat (Abb. 4) (Rybakova et al., 2013). Dadurch wird die Funktion der Übertragung von Effektorproteinen

---

durch PVCs als mögliches T6SS bekräftigt (Mougous et al., 2006; Leiman et al., 2009; Heymann et al., 2013).

#### 2.3.1.4 *Toxin complex (Tc)-Toxine*

Die am besten untersuchte und als erste entdeckte Gruppe der Toxine aus *P. luminescens* ist die Gruppe der *Toxin complex (Tc)-Toxine*. Die Gruppenmitglieder sind auf dem Genom von *P. luminescens* auf den vier Genloci *tca*, *tcb*, *tcc* und *tcd* zu finden (Abb. 2) und kodieren für eine jeweils unterschiedliche Anzahl an Toxinsubkomplexen (Bowen et al., 1998). Tc-Toxine besitzen ein Molekulargewicht von mehr als einem Megadalton im nativen und 30 kDa bis 250 kDa im denaturierten Zustand. Bei Injektion in Insektenlarven wirken Tc-Toxine aller vier Genloci toxisch, wobei Tc-Toxine des *tca*- und *tcd*-Genlocus eine zusätzliche orale Toxizität aufweisen (Bowen et al., 1998).

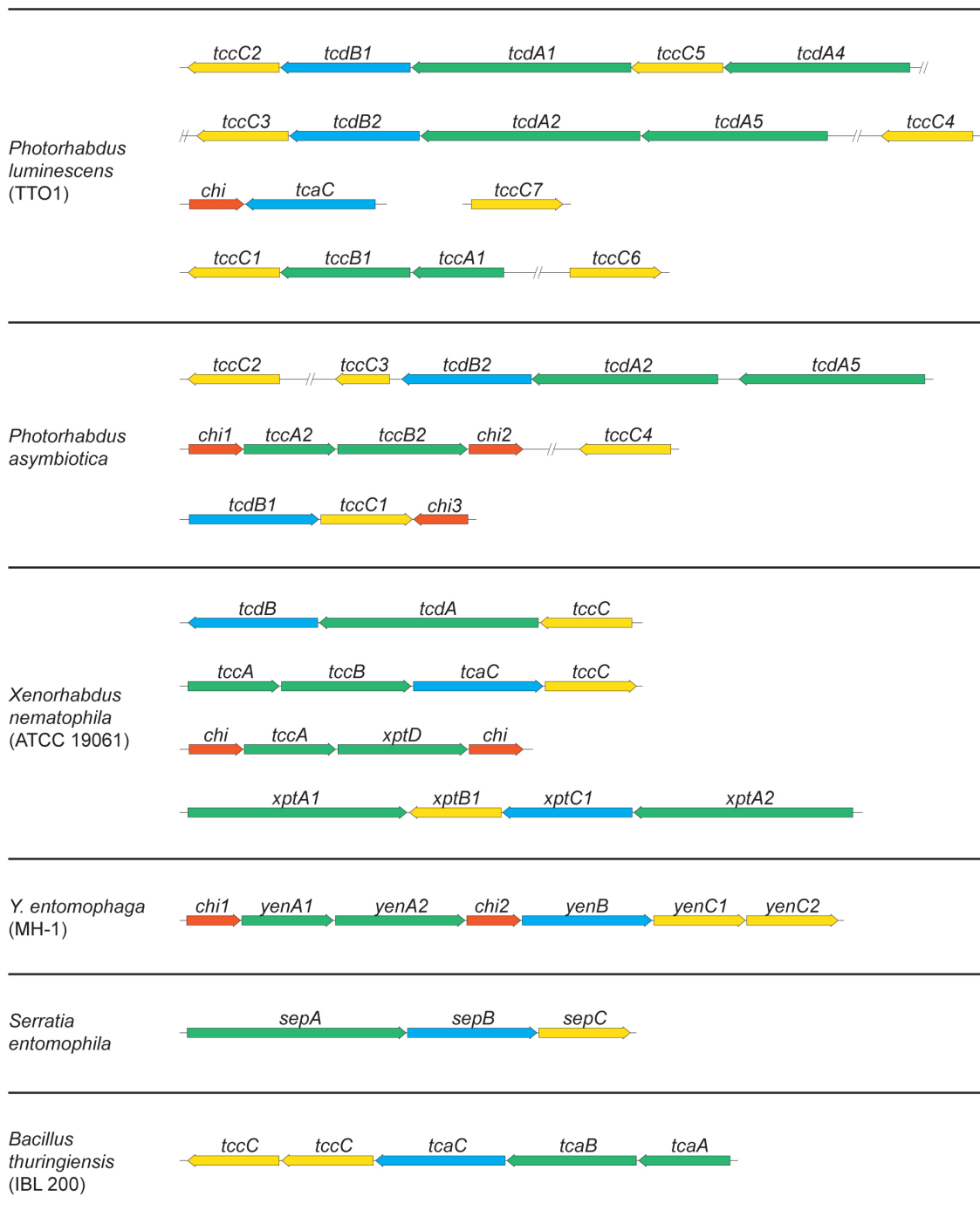
Die daraus resultierende genetische Diversität von Tc-Toxinen sowie Komplexizität auf dem jeweiligen Genom wird in den Folgeabschnitten genauer erörtert.

## 2.4 Genetische Diversität von Tc-Toxinen

Anhand von Aminosäuresequenzvergleichen wurden die durch die Gene *tca*, *tcb*, *tcc* und *tcd* kodierten Proteine in A-, B- oder C-Komponenten (Abb. 5) klassifiziert (Ffrench-Constant und Waterfield, 2005). A-, B- und C-Komponenten bilden einen oligomeren ABC-Komplex, der Toxizität gegenüber Insektenlarven zeigt. Im Vergleich dazu wirkt jede einzelne Komponente lediglich nur schwach toxisch (Waterfield et al., 2005).

Neben Tc-Toxinen aus *P. luminescens* wurden weitere Tc-Toxine aus insektpathogenen Prokaryonten wie *Photorhabdus asymbiotica*, *Xenorhabdus nematophila*, *Yersinia entomophaga*, *Serratia entomophila* und *Bacillus thuringiensis* isoliert (Ffrench-Constant und Bowen, 1999; Hurst et al., 2000; Wilkinson et al., 2009; Blackburn et al., 2011; Hurst et al., 2011). Wie in Abb. 5 dargestellt findet man auf dem Genom oder Virulenzplasmid der jeweiligen insektenpathogenen Prokaryonten eine unterschiedliche Anzahl an Genen, die Tc-Toxine kodieren. Diese Diversität von Tc-Toxinen lässt sich aus evolutionärer Sicht durch Genduplikationen bzw. Gendeletionen auf dem jeweiligen Chromosom oder durch nicht komplette Genomsequenzierungen erklären (Hinchliffe et al., 2010). Das Auftreten von Tc-Toxinen auf Virulenzplasmiden wie zum Beispiel auf dem Plasmid pADAP aus *Serratia*

*entomophila* zeigt, dass Tc-Toxine zwischen unterschiedlichen Prokaryontenarten übertragen werden können (Hurst et al., 2000). Dies wäre auch eine Erklärung für das Vorkommen von Tc-



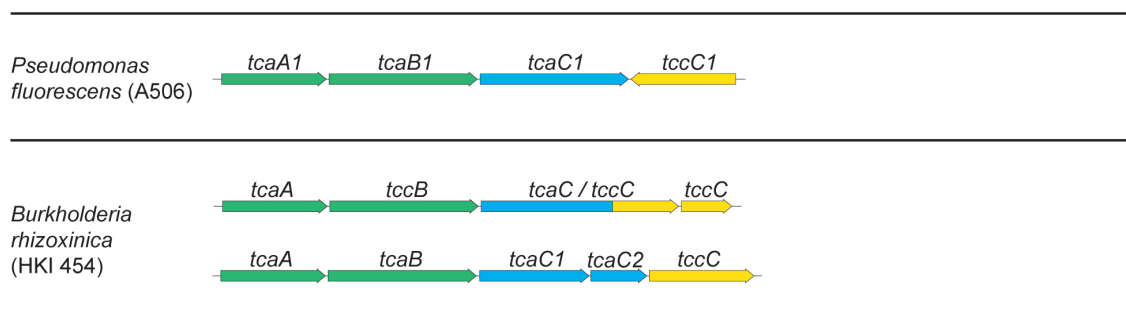
**Abb. 5: Schematische Darstellung von Tc-Toxinen innerhalb der Genloci von insektenpathogenen Prokaryonten**

Die Gene, die in einem Tc-Toxin für eine A- (grün), B- (blau) oder C-Komponente (gelb) sowie für eine Chitinase (rot) kodieren, sind als Pfeile in jeweiligen Größenverhältnis dargestellt. Jede zusammenhängende Kette von Genen stellt einen Genlocus auf dem jeweiligen Genom oder Plasmid eines Organismus dar. Rechtsläufige Pfeile deuten das Leseraster der Gene auf dem „+“-Strang der genomischen DNA an, linksläufige auf dem „-“-Strang.

Toxinen in pflanzenpathogenen Prokaryonten wie zum Beispiel *Pseudomonas syringae* (Hinchliffe et al., 2010).

In unmittelbarer Nähe einzelner Tc-Toxingene treten bei insektenpathogenen Prokaryonten vermehrt Gene auf, die Chitinasen kodieren, sogenannte *chi*-Gene. Durch die Deletion eines *chi*-Gens im Genlocus von *Xenorhabdus nematophila* wird die insektizide Toxizität nicht beeinträchtigt (Morgan et al., 2001). Hingegen werden zwei Chitinasen im Tc-Toxin-Genlocus von *Yersinia entomophaga* für eine vollständige insektizide Aktivität benötigt, weil beide Proteine möglicherweise wichtig für den Abbau von Chitinfibrillen in der peritrophen Matrix des Insektendarms sind. Erst der Abbau des Chitin-Netzwerks ermöglicht, dass das Tc-Toxin ungehindert in die Zielzellen eintreten kann (Landsberg et al., 2011).

Die gramnegativen Prokaryonten *Pseudomonas fluorescens* beziehungsweise *Burkholderia rhizoxinica* leben endosymbiontisch in den pflanzenpathogenen Pilzen *Tuber melanosporum* bzw. *Rhizopus microsporus*. Deren Tc-Toxin-Genloci enthalten keine *chi*-Gene (Abb. 6).

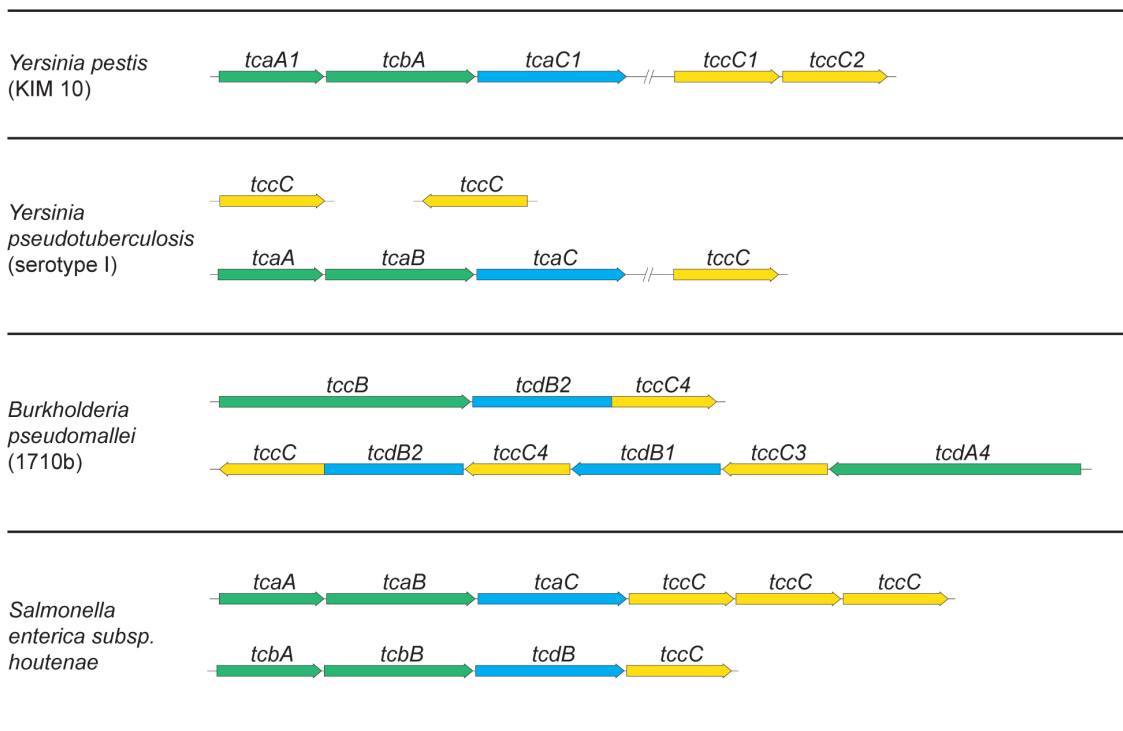


**Abb. 6: Schematische Darstellung von Tc-Toxinen innerhalb der Genloci von pflanzenpathogenen Prokaryonten**

Die Gene, die in einem Tc-Toxin für eine A- (grün), B- (blau) oder C-Komponente (gelb) kodieren, sind als Pfeile im jeweiligen Größenverhältnis dargestellt. Jede zusammenhängende Kette von Genen stellt einen Genlocus auf dem jeweiligen Genom oder Plasmid eines Organismus dar. Rechtsläufige Pfeile deuten das Leseraster der Gene auf dem „+“-Strang der genomischen DNA an, linksläufige auf dem „-“-Strang.

Interessanterweise liegen B- und C-Komponenten in *Burkholderia rhizoxinica* sowie in dem humanpathogenen Prokaryonten *Burkholderia pseudomallei* (Abb. 7) als Fusionsprotein vor und werden in einem *open reading frame* (orf) exprimiert. Diese BC-Fusionsproteine findet man auch in anderen Prokaryonten wie zum Beispiel bei *Pseudomonas*, *Ralstonia* oder *Rhodococcus* und lassen vermuten, dass B- und C-Komponente eine funktionelle Einheit bilden (Waterfield et al., 2007; Hinchliffe et al., 2010). Desweiteren findet man sowohl B- als auch C-Komponenten auf dem Genom von Prokaryonten in einer weit aus höhereren Anzahl und auch weit entfernt

von A-Komponenten, wodurch zusätzliche Funktionen von BC-Komponenten vermutet werden (Yang und Waterfield, 2013).



**Abb. 7: Schematische Darstellung von Tc-Toxinen innerhalb der Genloci von humanpathogenen Prokaryonten**

Die Gene, die in einem Tc-Toxin für eine A- (grün), B- (blau) oder C-Komponente (gelb) kodieren, sind als Pfeile im jeweiligen Größenverhältnis dargestellt. Jede zusammenhängende Kette von Genen stellt einen Genlocus auf dem jeweiligen Genom oder Plasmid eines Organismus dar. Rechtsläufige Pfeile deuten das Leseraster der Gene auf dem „+“-Strang der genomischen DNA an, linksläufige auf dem „-“-Strang.

Humanpathogene Prokaryonten wie zum Beispiel *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* oder *Burkholderia pseudomallei* erlangten in den letzten Jahren immer mehr Aufmerksamkeit, da sie auf ihrem Genom auch Gene besitzen, die für Tc-Toxine kodieren (Abb. 7). Das Genom von *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* enthält jeweils nur einen Genlocus eines kompletten Tc-Toxinkomplexes (Abb. 7). Diese Tc-Toxine zeigen sowohl insektizide als auch humane Toxizität (Hares et al., 2008). Zusätzlich identifizierte man eine unterschiedliche Zellspezifität bei Tc-Toxinen von *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* (Pinheiro und Ellar, 2007).

Das Genom des humanpathogenen Prokaryonts *Burkholderia pseudomallei* enthält mindestens zwei Genloci, die für Tc-Toxinkomplexe kodieren (Abb. 7) Diese könnten bei der Übertragung

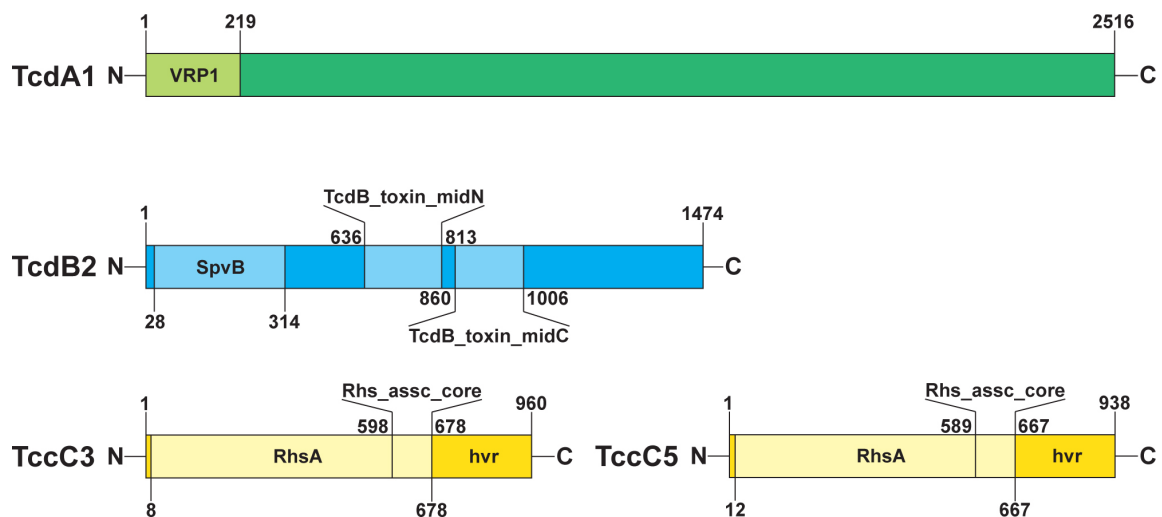


der Melliidose, eine tödliche Infektionskrankheit, von entscheidender Bedeutung sein (Yang und Waterfield, 2013).

*Salmonella enterica*, der Erreger der durch Salmonellen ausgelösten Gastroenteritis, ist ein weiterer humanpathogener Prokaryont, der auch mindestens zwei komplette Tc-Toxin-Genloci (Abb. 7) aufweist. Desweiteren besitzt *Salmonella enterica* ein zusätzliches Toxin, welches auf proteinbiochemischer Ebene Gemeinsamkeiten zu Tc-Toxinen aus *P. luminescens* erkennen lässt (Aktories et al., 2011).

## 2.5 Proteinbiochemische Untersuchungen von Tc-Toxinen

Tc-Toxinkomplexe aus *P. luminescens* modifizieren Aktin und führen dadurch zu einem Zusammenbruch des Zytoskeletts. Zwei ADP-Ribosyltransferasen der C-terminalen Domäne von TccC3 bzw. TccC5 (im weiteren C3 bzw. C5 genannt, siehe Abb. 8) sind für die toxische Modifizierung von Aktin verantwortlich. C3 bzw. C5 ADP-ribosylieren G-Aktin bzw. die GTPase



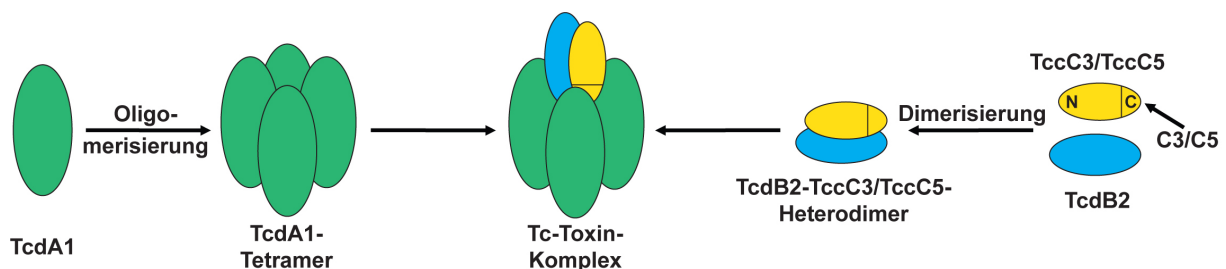
**Abb. 8:** Darstellung der Domänenstruktur von TcdA1, TcdB2, TccC3 sowie TccC5 aus *Photobacterium luminescens*

Durch die strukturelle Analyse der Aminosäuresequenzen von TcdA1 (grün), TcdB2 (blau), TccC3 (gelb) und TccC5 (gelb) mit Hilfe der Datenbanken PFAM, TIGRFAM und COG konnten folgende Domänen identifiziert werden: *Salmonella virulence plasmid 28.1kDa A protein* VRP1 (pfam03058), *Salmonella virulence plasmid 65kDa B protein* SpvB (pfam03534), *Insecticide toxin TcdB middle / N-terminal region* (pfam12256), *Insecticide toxin TcdB middle / C-terminal region* (pfam12255), *RHS-repeat associated core domain* (TIGR03696) und *RHS family protein* RhsA (COG3209). Die hvr ist nicht homolog zu bekannten Proteinen oder Domänen und beschreibt in TccC3 und TccC5 eine mono-ADP-Ribosyltransferase (modifizierte Abbildung nach Lang et al., 2010).

RhoA an Threonin 148 bzw. Glutamin 61 und 62, wodurch eine Überpolymerisation und Vernetzung von Aktin initiiert wird (Lang et al., 2010).

SpvB, ein Virulenzfaktor aus *Salmonella enterica*, agiert ebenfalls als ADP-Ribosyltransferase. Es ADP-ribosyliert G-Aktin an Arginin 177 (Hochmann et al., 2006; Barth und Aktories, 2011). im Gegensatz zu Tc-Toxinen kommt es aber hierbei zu einer Depolymerisation des Aktinnetzwerkes. SpvB und C3 bzw. C5 zeigen, dass eine ADP-Ribosylierung von unterschiedlichen Aminosäuren das Polymerisationsverhalten von G-Aktin entgegengesetzt verändert, aber gleichermaßen das Zytoskelett der Zielzellen schädigt (Aktories et al., 2012).

Auch TccC3 und TccC5 sind an der Bildung von Komplexen mit TcdB2 und TcdA1 beteiligt (Abb. 8 und 9) (Lang et al., 2010). Eine Komplexbildung konnte auch bei den Tc-Toxinen



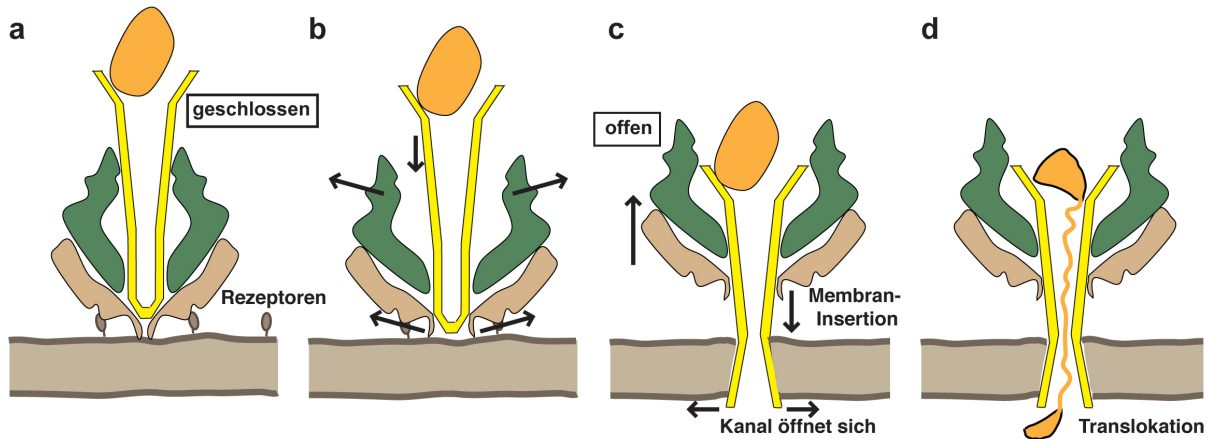
**Abb. 9: Modell der Komplexbildung von Tc-Toxinen**

Ein Tc-Toxinkomplex setzt sich zusammen aus einem zuvor oligomerisierten TcdA1 (grün) Tetramer sowie einen heterodimeren Komplex aus TcdB2 (blau) und TccC3 (gelb) bzw. TccC5 (gelb) (modifizierte Abbildung nach Lang et al., 2010).

XptA2, XptB1 und XptC1 aus *Xenorhabdus nematophila* nachgewiesen werden und zeigte auch insektizide Toxizität. In weiterführenden Experimenten führt nur XptA2 unabhängig von XptB1 und XptC1 zu einer Porenbildung in künstlichen Membranen. Zusätzlich scheint XptA2 mit einem Molekulargewicht von etwa einem MDa zu tetramersieren, wohingegen XptB1 und XptC1 als Monomere auftreten (Sheets et al., 2011). Weitere Beispiele für komplexbildende Tc-Toxine sind YenABC aus *Yersinia entomophaga*, TcaA-TcaB-TccC1 aus *Yersinia pseudotuberculosis* sowie YitABC-YipA / B aus *Yersinia pestis* (Hurst et al., 2011; Odinkov et al., 2011; Spinner, 2012).

Auf Basis dieser Ergebnisse haben Lang et al. ein Modell (Abb. 9) für die Bildung von Komplexen der Komponenten TcdA1, TcdB2 und TccC3 bzw. TccC5 aus *P. luminescens* aufgestellt (Lang et al., 2010). Elektronenmikroskopische Experimente führten zu einem detaillierteren Modell der Toxinkomplexbildung und der Translokation der toxischen

Komponente (Gatsogiannis et al., 2013). Genauer gesagt ändert TcdA1 seine Konformation und durchstößt die Zellmembran, um die toxische Komponente in einem wahrscheinlich ungefalteten Zustand in die Wirtszelle zu translozieren (Abb. 10).



**Abb. 10: Modell der Translokation von Tc-Toxinen**

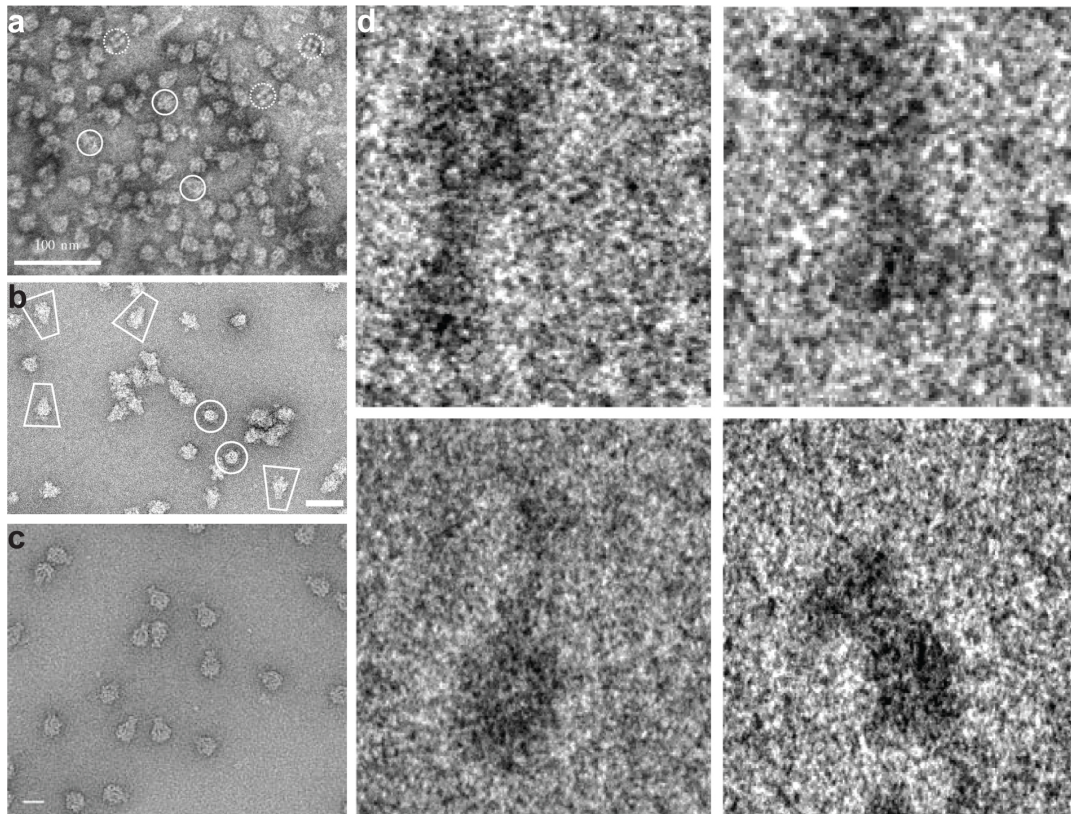
(a) Das Holotoxin bindet an Rezeptoren der Wirtszellmembran in einer geschlossenen Konformation. (b) Während der Konformationsänderung in TcdA1 öffnet sich dessen äußere Hülldomäne, damit (c) der Translokationskanal die Wirtszellmembran durchstoßen kann und nach Öffnung des Kanals die (d) toxische Komponente in die Wirtszelle transloziert (modifizierte Abbildung nach Gatsogiannis et al., 2013).

Obwohl einzelne A-, B- und C-Komponenten nicht auf demselben Genlocus liegen, können sie einen Tc-Toxinkomplex ausbilden. Dadurch wird eine Austauschbarkeit einzelner Toxinkomponenten sowie eine gewisse Flexibilität innerhalb des Genoms oder Virulenzplasmids ermöglicht, wodurch die Effektivität einer Tc-Toxinkomplexbildung erhöht werden könnte (Hincliffe et al., 2010). Zusätzlich lässt die hohe Ähnlichkeit einzelner A-, B- und C-Komponenten zu ihren Homologen vermuten, dass die Komplex- bzw. Porenbildung in Tc-Toxinen einem ähnlichen Mechanismus bei insekten-, pflanzen- und humanpathogenen Prokaryonten unterliegen (Lang et al., 2010).

## 2.6 Strukturbiochemische Untersuchungen an Tc-Toxinen

Da Tc-Toxine ein sehr hohes Molekulargewicht von über 1 MDa besitzen, bietet sich bei diesen Komplexen eine Strukturanalyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie an. Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von XptA1 aus *Xenorhabdus nematophila* (Abb. 11a) beschreiben eine Elektronendichtemappe eines XptA1-Tetramers mit einer Auflösung von etwa 20 Å (Abb. 12). Die Struktur des XptA1-Tetramers hat ein experimentell bestimmtes Molekulargewicht von etwa 1,2 MDa und baut einen ca. 19 nm

langen und 16 nm breiten Zylinder mit einem großen hohlen Innenraum auf (Abb. 12). Die Autoren spekulierten, dass XptA1 die Untereinheiten XptB1 und XptC1 in diesem Hohlraum binden und mit einem nicht bekannten Mechanismus über die Membran in die Wirtszelle transportieren könnten (Lee et al., 2007).

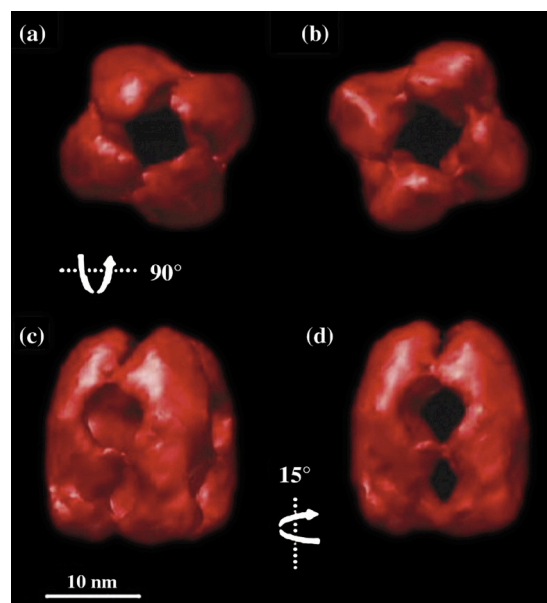


**Abb. 11: Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Tc-Toxinen**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (a) heterolog exprimiertem XptA1 aus *Xenorhabdus nematophila* (durchgehende bzw. gestrichelte Kreise zeigen unterschiedliche Ansichten eines XptA1-Tetramers), (b) nativ isoliertem Tc-Toxinkomplex aus *Yersinia entomophaga* (rautenförmige bzw. runde Rahmen illustrieren Seiten- bzw. Drauf-/Untersichten eines Tc-Toxinkomplexes; die Maßstabskala beträgt 50 nm) und (c) heterolog exprimiertem TcdA1 aus *Photorhabdus luminescens* (die Maßstabskala entspricht 10 nm). Vergrößerte Darstellung kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen von (d) vier Tca-Molekülen aus *Yersinia pseudotuberculosis*. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden extrahiert aus Lee et al., 2007, Hinchliffe et al., 2010 und Landsberg et al., 2011 und Gatsogiannis et al., 2013.

Im Gegensatz zu einem XptA1-Tetramer stellen elektronenmikroskopische Aufnahmen des Tc-Toxinkomplexes aus *Yersinia entomophaga* (Abb. 11b) in einer 3D-Rekonstruktion (Abb. 13a) ein Pentamer mit einer Auflösung von etwa 17 Å dar (Landsberg et al., 2011). Der Komplex hat ein Molekulargewicht von mehr als 2 MDa und beschreibt eine 26 nm lange und 22 nm breite flaschenförmige Struktur. Sie setzt sich zusammen aus einem YenA1/YenA2-Pentamer sowie jeweils fünf Chitinase 1 (Chi1) und fünf Chitinase 2 (Chi2) Molekülen, die an der äußeren Hülle

des Pentamers angeheftet sind (Abb. 13a). Der Komplex beherbergt in dessen Innenraum einen nach oben offenen zentralen Kanal sowie eine Bindestelle für YenB und YenC1/YenC2 am YenA1/YenA2-Flaschenkopf (Landsberg et al., 2011). Ein pentamerer oligomerer Zustand (Abb. 11c) wird durch eine kryoelektronenmikroskopische Struktur von TcdA1 bei einer Auflösung von 6,3 Å bestätigt (Abb. 13b) (Gatsogiannis et al., 2013). Desweiteren zeigt die Struktur einen zentralen porenähnlichen Kanal und eine äußere Hülle, die sich bei Konformationsänderung öffnet und dadurch der Kanal die Zellmembran durchstoßen kann (Abb. 10c).

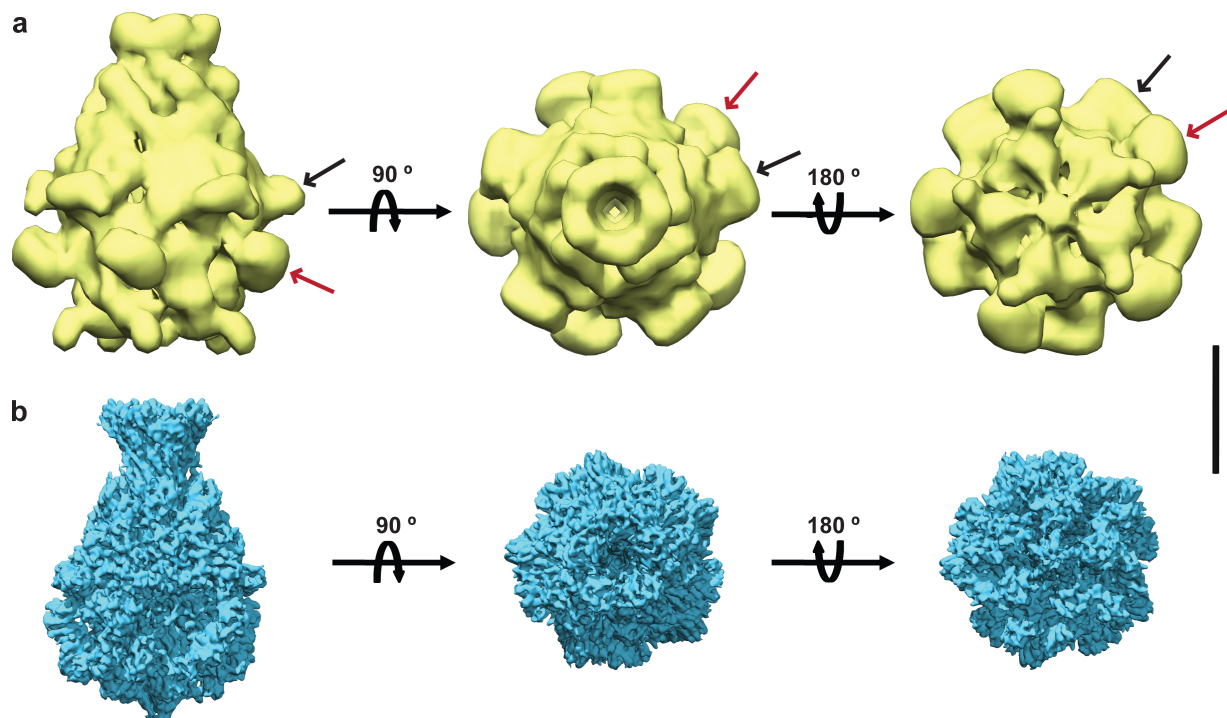


**Abb. 12: Elektronenmikroskopische Struktur eines XptA1-Tetramers aus *Xenorhabdus nematophila***

(a,b) Draufsicht und (c,d) Seitenansicht einer aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen berechneten 3D-Rekonstruktion eines XptA1-Pentamers (rot). Die (a) Draufsichten bzw. (c) Seitenansichten wurden in (b) und (d) um jeweils 15 ° gekippt, um den Innenraum der Struktur besser darzustellen. Die Abbildung der 3D-Rekonstruktion wurde aus Lee et al., 2007 entnommen.

Die in Abb. 11d dargestellten kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen von TcA-Partikeln aus *Yersinia pseudotuberculosis* lassen eine flaschenförmige Struktur vermuten, jedoch konnte bis heute keine 3D-Rekonstruktion berechnet werden (Hinchliffe et al., 2010). Auch durch andere strukturelle Methoden wie z.B. Kernspinresonanz- (NMR-) Spektroskopie oder Röntgenkristallographie konnte keine detailliertere Struktur eines Tc-Toxins bei atomarer

Auflösung ermittelt werden. Zusätzlich existieren keine homologen Proteinstrukturen, die eine potentielle atomare Struktur eines Tc-Toxins vermuten lassen könnten.



**Abb. 13: Elektronenmikroskopische Struktur von YenA1/A2 aus *Yersinia entomophaga* und TcdA1 aus *Photobacterium luminescens***

Seitenansicht, Draufsicht und Untersicht (links nach rechts) einer (a) 17 Å Elektronendichtemappe von YenA1/YenA2 aus *Yersinia entomophaga* (EM-Datenbanknummer EMD-1978) und (b) einer 6,3 Å Elektronendichtemappe von TcdA1 aus *Photobacterium luminescens* (EM-Datenbanknummer EMD-2297). Die Maßstabskala (schwarzer Balken) entspricht 100 Å. Chi1 = schwarzer Pfeil, Chi2 = roter Pfeil.

Deshalb sind Tc-Toxine aus struktureller Sicht bis heute sehr interessante Zielproteine. Eine hochaufgelöste Struktur könnte als Grundlage für neue Einblicke in die Funktion von Tc-Toxinen, das heißt in die Tc-Toxinkomplexbildung sowie in die Tc-Toxin-Membrantranslokation dienen.

---

## 2.7 Zielsetzung

Tc-Toxine bilden 1,2 bis 2,1 MDa große Proteinkomplexe, die nicht nur durch insekten- und pflanzenpathogene Prokaryonten, sondern auch durch humanpathogene wie *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia pestis* sezerniert werden. Diese sezernierten Toxine greifen extrazellulär an Zielzellen an, dringen in diese ein und führen in den meisten Fällen zu deren Tod. Weder die Strukturen und Funktionen der einzelnen Toxinkomponenten noch der Mechanismus der Tc-Toxine waren zu Beginn der Dissertation im Detail bekannt. Ziel dieser Doktorarbeit war es, die dreidimensionalen Strukturen einer TcA-, TcB- und TcC-Komponente aus *Photorhabdus luminescens* mittels Röntgenkristallographie zu erhalten. Hierzu wurde die TcA-Komponente TcdA1 sowie die TcB-TcC-Komponenten als Fusionsprotein TcdB2-TccC3 in gereinigter Form zur Verfügung gestellt. Die erhaltenen Proteinkristalle sollten mit Hilfe hausinterner Röntgenquellen sowie Synchrotronstrahlung an externen Elektronenbeschleunigern auf Röntgenbeugung untersucht werden. Da hochaufgelöste Strukturen von TcdA1- und TcdB2-TccC3-Homologen nicht bekannt sind, sollten experimentelle Phasierungsansätze nach Schwermetallderivatisierung von Proteinkristallen durchgeführt werden. Zudem sollte in unabhängigen Phasierungsexperimenten eine kryoelektronenmikroskopische Struktur von TcdA1 als Alternative zur Schwermetallderivatisierung dienen.





## 3 MATERIALIEN

### 3.1 Geräte / Zubehör

Tab. 1: Geräte / Zubehör

Geräte / Zubehör	Hersteller
1100 Series HPLC System, Grace Vydac 214TP C4 5µ Säule Allegra X22-R Zentrifuge	Agilent Technologies GmbH (Böblingen, DE) Beckman Coulter, Inc. (Brea, USA)
Mini-Protean 3 SDS-PAGE Gelelektrophorese- system, Power Pack 200 Netzgerät MICROSTAR Röntgenquelle	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)  Bruker AXS, Inc. (Madison, USA)
FEMPTO Plasma Cleaner	Diener electronic GmbH & Co. KG (Ebhausen, DE)
5415R Zentrifuge	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Rock Imager 1000 Visualisierungs-/ Dokumentationssystem	Formulatics, Inc. (Waltham, USA)
Äkta purifier FPLC, MonoQ 5/50 GL Superose 6 10/300 GL	GE Healthcare Biosciences (Pittsburgh, USA)
JEM-1400 Transmissionselektronenmikroskop	JEOL GmbH (Eching, DE)
MZ16 Stereomikroskop	Leica Mikrosysteme GmbH (Wetzlar, DE)
mar345 2D Flächendetektor	Marresearch GmbH (Norderstedt, DE)
CH30 & CX40 Durchlichtmikroskop	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, DE)
LIQUIDATOR96 96-Kanal Pipettierer	Steinbrenner Laborsysteme GmbH (Wiesenbach, DE)
NanoDrop 1000 UV-Vis-Spektrometer	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, USA)
Mosquito Crystal Pipettierroboter	TTP Labtech Ltd. (Hertfordshire, UK)

## 3.2 Chemikalien / Lösungen

Tab. 2: Chemikalien / Lösungen

<b>Chemikalien / Lösungen</b>	<b>Hersteller</b>
Kolloidale Lösung	Fluka Chemie GmbH (München, DE)
Dithiothreitol	GERBU Biotechnik GmbH (Heidelberg, DE)
Kaliumtetrachloroplatinat, Kaliumtetranitroplatinat	Johnson Matthey GmbH (Sulzbach, DE)
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Uranylformiat	Polysciences, Inc. (Warrington, USA)
Glycin, HEPES, Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE)
Ammoniumpersulfat, Ammoniumsulfat, Glycerin, HEPES, Jeffamine ED-2001, Lithiumsulfat, Magnesiumacetat, Magnesiumchlorid, Mersalylsäure, Natriumchlorid, Natriumcitrat, tr- Natriumcitrat, Natriummalonat, PEG 400, PEG 4000, PEG 5000 MME, PCMBS, PIP, Thiomersal, TRIS, Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DE)

### 3.3 Pufferlösungen

Tab. 3: Pufferlösungen

Pufferlösung	Zusammensetzung
TcdB2-TccC3-Dialysepuffer	50 mM TRIS pH 8 50 mM NaCl 0,05 % Tween-20
TcdA1-Dialysepuffer I	50 mM TRIS pH 8 100 mM NaCl 0,05 % Tween-20
TcdA1-Dialysepuffer II	50 mM MES pH 5 100 mM NaCl 0,05 % Tween-20
TcdB2-TccC3-IEX-Puffer 1	50 mM TRIS pH 8 50 mM NaCl 0,05 % Tween-20
TcdB2-TccC3-IEX-Puffer 2	50 mM TRIS pH 8 1 M NaCl 0,05 % Tween-20
TcdB2-TccC3-SEC-Puffer	25 mM TRIS pH 8 100 mM NaCl 0,05 % Tween-20
TcdA1-SEC-Puffer	25 mM HEPES pH 7 100 mM NaCl 0,05 % Tween-20
TcdA1-SEC-Puffer II	25 mM MES pH 5 100 mM NaCl 0,05 % Tween-20
4x SDS-Probenpuffer	250 mM TRIS 100 mM DTT 6 % SDS 40 % Glycerin 0,02 % Bromphenolblau
10x SDS-Laufpuffer	250 mM TRIS 1,9 M Glycin 2,8 % SDS
Coomassielösung	0,15 % Coomassie Brilliant Blau 44 % Ethanol 12 % Essigsäure

<b>Pufferlösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
TcdA1-Kristallisationspuffer I	100 mM HEPES pH 7 1,1 M Natriummalonat 0,5 % Jeffamine ED-2001
TcdA1-Kristallisationspuffer II	100 mM TRIS pH 8,5 200 mM LiSO <sub>4</sub> 1,26 M Ammoniumsulfat
TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer I	100 mM Natriumcitrat pH 5,6 100 mM Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> 10 % PEG 5000 MME
TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer II	100 mM tri-Natriumcitrat pH 5,5 100 mM NaCl 100 mM MgCl <sub>2</sub> 12 % PEG 4000

### 3.4 Kitsysteme

Tab. 4: Kitsysteme

<b>Kitsystem</b>	<b>Hersteller</b>
NeXtal JCSG Core I-IV, MbClass I+II, PEGs I+II, Classics I+II, ProComplex, PACT	Qiagen GmbH (Hilden, DE)

### 3.5 Enzyme / Proteinstandards

Tab. 5: Enzyme / Proteinstandards

<b>Enzym / Proteinstandards</b>	<b>Hersteller</b>
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DE)
PageRuler Prestained Protein Ladder, Spectra Multicolor High Range Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, USA)



## 3.6 Software

Tab. 6: Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Illustrator CS5, Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems (München, DE)
XDS Programmpaket	Max Planck Institut für medizinische Forschung (Heidelberg, DE)
Microsoft Office 2008 Programmpaket	Microsoft (Redmond, USA)
Phenix Programmpaket	Phenix Industrial Consortium (Berkeley, USA)
Coot 0.6.2	University of Cambridge (Cambridge, UK)
Chimera 8.6	University of California (San Francisco, USA)

---

## 4 METHODEN

Die DNA-Konstrukte der *tcdA1*, *tcdB2* und *tccc3* Gene, die für TcdA1 und das TcdB2-TccC3-Fusionsprotein kodieren, wurden von Herrn Dr. Alexander Lang generiert (Lang et al., 2010). Desweiteren führte Herr Dr. Alexander Lang die Proteinproduktion und die Metallionen-affinitätschromatographie von TcdA1 und des TcdB2-TccC3-Fusionsprotein durch. Anschließend reinigte ich TcdA1 sowie das TcdB2-TccC3-Fusionsprotein mittels Größenausschlusschromatographie auf, um deren Proteinkristallisation in hoch reiner Form zu ermöglichen.

### 4.1 Proteinbiochemische & bioanalytische Methoden

#### 4.1.1 Größenausschlusschromatographie

Für weitere strukturbiochemische Analysen von TcdA1 und TcdB2-TccC3 mittels Röntgenkristallographie und Elektronenmikroskopie müssen beide Proteine in einer hoch reinen Form vorliegen. Hierfür wurden sie mittels Größenausschlusschromatographie (SEC), auch Gelfiltration (GF) genannt, in einem finalen Schritt aufgereinigt. Bei dieser Chromatographiemethode werden Makromoleküle ihrer Größe nach aufgetrennt (Andrews, 1966). Im Detail laufen Makromoleküle an einer stationären Phase vorbei, die aus einer polymeren Matrix besteht. Während der Trennung von Makromolekülen eluieren große Makromoleküle bei konstanter Flussrate schneller, da sie aufgrund der größeren Oberfläche weniger Raum zwischen den Matrixmolekülen einnehmen können. Daher ist ihre zu adsorbierende Oberfläche in der Matrix kleiner und sie eluieren schneller als kleine Makromoleküle.

Für die Kristallisationsexperimente wurde TcdA1 in TcdA1-SEC-Puffer I bzw. II gereinigt. Hierfür wurden zuerst die zugesendeten TcdA1-Eluate mittels Dialyse bei einem Ausschlussvolumen von 100 kDa gegen TcdA-Dialysepuffer I bzw. II ausgetauscht. Anschließend wurde eine Superose 6 10/300 GL Säule (GE Healthcare) in TcdA1-SEC-Puffer I bzw. II äquilibriert und im weiteren Verlauf 500 µL des jeweiligen TcdA1-Dialysats über die Säule aufgetrennt. Der oligomere Zustand und die Reinheit der TcdA1-Proben wurden mittels Negativkontrastierung-Transmissionselektronenmikroskopie überprüft (siehe Abschnitt 4.3.1).

---

Das TcdB2-TccC3-Fusionsprotein besitzt ein Molekulargewicht von circa 275 kDa und wurde mit einer dem Molekulargewicht und Trennleistung entsprechenden Superose 6 10/300 GL Säule (GE Healthcare) isoliert. Hierfür wurde die Säule in TcdB2-TccC3-SEC-Puffer äquilibriert. Die eingefrorenen TcdB2-TccC3-Eluate wurden vereinigt und das Probenvolumen mittels Konzentratoren, die ein 100 kDa Ausschlussvolumen besitzen, auf 1 bis 2 mL Endvolumen eingengt. Jeweils 500 µL des aufkonzentrierten TcdB2-TccC3-Eluats wurden über die Superose 6 10/300 GL Säule aufgetrennt und die jeweiligen TcdB2-TccC3-Fractionen für nachfolgende Kristallisationsexperimente verwendet.

#### 4.1.2 Visualisierung von denaturierten Proteinen mittels SDS-PAGE

Um die Reinheit oder das Molekulargewicht von Proteinen schnell und effektiv zu überprüfen, erweist sich die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) als eine optimale Methode. Hierbei werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-Moleküle mit negativen Ladungen versehen und in einer Polymer- bzw. Gelmatrix über ein elektrisches Feld ihrer Größe nach aufgetrennt (Raymond et al., 1964; Shapiro et al., 1967). Die Konzentration der Polymer- bzw. Gelmatrix ist variabel wählbar, um Proteine in einem bestimmten Molekulargewichtsbereich oder einem Gelgradienten zu trennen (Ruchel et al., 1973). Das Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins wird mit Proteinen bekannten Molekulargewichts verglichen. Für die Visualisierung der getrennten Proteine werden die Polymere bzw. Gele mit einem Farbstoff, der spezifisch Proteine anfärbt (z.B. Coomassie Brilliantblau), versehen (Wilson, 1979).

Aufgereinigtes TcdA1 bzw. TcdB2-TccC3-Fusionsprotein wurden ohne SDS-PAGE-Analyse direkt mittels Negativkontrastierung-Transmissionselektronenmikroskopie (Abschnitt 4.3.1) visualisiert. Eine SDS-PAGE wurde von TcdB2-TccC3-Kristallen durchgeführt. Hierfür wurden 15 TcdB2-TccC3-Kristalle (siehe Abschnitt 4.2.2.5) dreimal in TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer I gewaschen und in 20 µL SDS-Probenpuffer bei 95 °C für fünf Minuten denaturiert. Anschließend wurde die Probe in einem 4 bis 20 %igen Gradientengel aufgetrennt, und die Proteine wurden mit einer Coomassie-Brilliantblau-Lösung angefärbt. Nach Entfärbung des Gels wurden die Coomassie-gefärbten Proteinbanden für einen tryptischen In-Gel Verdau mit einem Skalpell ausgeschnitten und weiterverarbeitet.

---

### 4.1.3 Tryptischer In-Gel Verdau elektrophoretisch getrennter Proteine

Der In-Gel Verdau von elektrophoretisch getrennten Proteinen ist eine Methode, bei der Proteine in einer Gelmatrix enzymatisch verdaut und im weiteren Verlauf die resultierenden Spaltprodukte bzw. Peptide chromatographisch und massenspektrometrisch analysiert werden (Rosenfeld et al., 1992). Neben der Entfernung des Coomassie-Farbstoffs durch organische Lösemittel wird die Disulfidbildung der getrennten Proteine durch reduzierende und alkylierende Bedingungen unterdrückt, um die Peptidausbeute durch eine bessere Zugänglichkeit der entfalteten Proteine für die zu spaltenden Enzyme zu erhöhen (Jeno et al., 1995). Nach Verdau der Proteine werden deren Spaltprodukte aus der Gelmatrix mit einem Puffer-Lösemittelgemisch extrahiert, eingedampft und chromatographisch sowie massenspektrometrisch (z.B. HPLC-MS) analysiert.

Die SDS-PAGE der TcdB2-TccC3-Kristalle (Abschnitt 4.1.3) zeigte Proteinbanden, die jeweils mit einem Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und getrennt voneinander weiterverarbeitet wurden. Nach dem Protokoll von Jenö et al. wurden die zerkleinerten Gelstücke zur Entfernung des Coomassie-Farbstoffs in Isopropanol und  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  abwechselnd dehydriert und hydriert (Jeno et al., 1995). Nach Reduktion bzw. Alkylierung wurden die Proteine im Gel tryptisch verdaut und anschließend mit mehreren Isopropanol- $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Waschschritten aus dem Gel extrahiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde bei Unterdruck und Wärme eingedampft und die Peptide wurden für eine weiterführende HPLC-MS-Analyse in 0,1 % Ameisensäure gelöst.

### 4.1.4 HPLC-MS-Peptidanalyse tryptisch verdauter Proteine

Eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit einer massenspektrometrischen (MS) Analyse ist eine Methode, bei der zuerst ein Peptidgemisch mittels eines HPLC-Experiments aufgetrennt und anschließend die einzelnen Peptide mittels MS identifiziert oder auch quantifiziert werden. Während eines HPLC-Experiments werden Peptide in einem Laufmittel (meist organische Lösemittel) über eine Trennsäule nach ihrer Größe, Ladung oder chemischen Zusammensetzung (z.B. Enantiomere) voneinander getrennt (Jolley und Freeman, 1968; Pettersson und Schill, 1981). Im weiteren Verlauf werden mit einer massenspektrometrischen Analyse die voneinander getrennten Peptide identifiziert und die einzelnen Massen über das Ionisationsverhalten der Peptide im elektrischen Feld genau bestimmt. Als Ionisationsmethode wurde bei der Analyse der TcdB2-TccC3-Kristall-Peptide die



---

Elektrosprayionisation (ESI) verwendet (Fenn et al., 1989). Bei dieser Methode wird die Probenlösung in einer feinen Kapillare verengt, an deren Spitze eine Spannung bzw. ein elektrisches Feld angelegt wird. In diesem elektrischen Feld werden die zu analysierenden Peptide in den Flüssigkeitstropfen ionisiert und bewegen sich in Richtung Gegenelektrode. Hierbei bestimmen die Ladungen der Ionen die letztendliche Masse des Peptids nach ihrem Masse zu Ladungsverhältnis ( $m/z$ ).

Die TcdB2-TccC3-Kristall-Peptide wurden von Frau Dr. Petra Janning (Abteilung für chemische Biologie, MPI Dortmund) über ein HPLC-Experiment voneinander getrennt und einer direkt gekoppelten ESI Massenspektrometer analysiert. Die nachgewiesenen Peptidsequenzen wurden mit Hilfe des Mascot-Servers ausgewertet und zusätzlich mit der Aminosäuresequenz von TcdB2 und TccC3 verglichen (Perkins et al., 1999).

#### **4.1.5 HPLC-ESI-Analyse nativer und semidenaturierter Proteine**

ESI-MS erweist sich als optimale Methode, um das Molekulargewicht von Proteinen mit nur einer Abweichung von wenigen Daltons nachzuweisen. Hierbei ist es möglich, Proteine bis zu einem Molekulargewicht von circa 130 kDa zu identifizieren (Fenn et al., 1989).

Für dieses Experiment wurden je 40  $\mu\text{L}$  aufgereinigtes TcdB2-TccC3 aus Abschnitt 4.1.2 bei 20 °C bzw. 95 °C für 30 Sek. inkubiert. Beide Proben wurden getrennt voneinander mittels einer C4-Säule eines HPLC-Systems (1100 Series, Agilent Technologies GmbH) entsalzt und direkt gekoppelt über ein ESI-Massenspektrometer (Finnigan LCQ Advantage Max, Thermo Fisher Scientific GmbH) analysiert. Anschließend wurden die jeweiligen Massenspektren, die die Intensitäten der Ionen in Abhängigkeit ihres jeweiligen  $m/z$  Verhältnisses zeigen, mit dem Programm Xcalibur aufgerufen und gespeichert. Nach Öffnung der gespeicherten Spektren mit dem Programm MagTran wurden diese über ein dekonvolutionäres Verfahren umgeschrieben, um das Molekulargewicht der ADP-Ribosyltransferase in Abhängigkeit von der Intensität darzustellen (Zhang et al., 1998).

#### **4.1.6 Proteinkonzentrationsbestimmung über UV-Absorption**

Die Proteinkonzentration des gereinigten TcdA1 und TcdB2-TccC3 wurde über deren UV-Absorption bei 280 nm ermittelt. Die Grundlage für diese Methode bilden die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, die bei 280 nm aufgrund ihres  $\pi$ -Elektronenringsystems ein Absorptionsmaximum aufweisen. Für die Bestimmung der

---

Proteinkonzentration wird der spezifische Extinktionskoeffizient für TcdA1 und TcdB2-TccC3 benötigt (Gill und Hippel, 1989), um anschließend die Proteinkonzentration über das Lambert-Beer'sche Gesetz zu berechnen (Commoner und Lipkin, 1949).

Mit Hilfe eines Nanodrop UV-Vis Spektrometers (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) wurde die Proteinkonzentration für TcdA1 und TcdB2-TccC3 bestimmt. Hierfür wurde der anhand der Aminosäuresequenz ermittelte theoretische Extinktionskoeffizient und das Molekulargewicht mit dem Programm ProtParam berechnet, um die Bestimmung der Proteinkonzentration spezifischer und dadurch genauer zu bestimmen (Gill und Hippel., 1989). Für die Messung wurde 1,5  $\mu\text{L}$  bis 2  $\mu\text{L}$  Proteinprobe luftblasenfrei auf den Nanodrop-Probenhalter pipettiert, um die experimentelle Proteinkonzentration bei 280 nm UV-Absorption zu erhalten.

## 4.2 Strukturbiologische Methoden

Nachdem TcdA1 und TcdB2-TccC3 in einem finalen Schritt mittels Größenausschlusschromatographie aufgereinigt worden waren, wurden die einzelnen Proteinfractionen mittels Negativkontrastierung fixiert und der oligomere Zustand von TcdA1 bzw. TcdB2-TccC3 mittels Transmissionselektronenmikroskopie analysiert. Bei einer homogenen Verteilung von TcdA1- bzw. TcdB2-TccC3-Molekülen wurden die jeweiligen zusammengehörigen Proteinproben vereint und für weiterführende Proteinkristallisationsexperimente aufkonzentriert.

### 4.2.1 Negativkontrastierung-Transmissionselektronenmikroskopie

Die Negativkontrastierung beschreibt eine Methode in der Elektronenmikroskopie, bei der eine Probe mittels einer Schwermetalllösung auf einem Kupfernetz fixiert und das Negativbild abgebildet wird. Dieses Negativbild wird durch den starken Elektronenstreuungseffekt der Schwermetalllösung erzeugt, die sich an die Proteinmoleküle anlagert und daher als Kontrastmittel fungiert (Ohi et al., 2004). Die Kupfernetze (G2400C, Plano GmbH) dienen dabei als Probenträger und sind aus nebeneinander liegenden rechteckigen Aussparungen aufgebaut. Vor der Probenfixierung werden diese Quadrate mit einem Kunststoffträgermaterial (Kollodiumlösung) überzogen und mit einem dünnen Kohlenstofffilm (Carbon Evaporator MED020, Bal-Tec@Leica) bedampft, um eine Trägeroberfläche für die Proteinprobe zu generieren. Eine anschließende Glimmentladung der mit Kohlenstoff bedampften Kupfernetze mittels eines Plasmareinigers (FEMPTO Plasma Cleaner, Diener electronic GmbH & Co. KG) führt zu einer sauberen, geladenen hydrophilen Kohlenstoffoberfläche, an der die Proteinlösung

---

adsorbieren kann. Eine ausführliche Beschreibung der Probenträgervorbereitung und Negativkontrastierung von Biomolekülen kann dem Bild- und Videomaterial aus Booth et al. entnommen werden (Booth et al., 2011).

Als Kontrastmittel wurde eine 0,75 %ige Uranylformiatlösung verwendet, die direkt vor Gebrauch hergestellt wurde. 37,5 mg Uranylformiat wurde mit 5 mL kochendem destilliertem Wasser in einem 20 mL Becherglas gemischt und unter ständigem Rühren im Dunkeln für 5 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 6 µL 5 M NaOH wurde die Lösung weitere 5 Minuten im Dunkeln gerührt, anschließend mittels eines 0,22 µm Filters von Schwebstoffen befreit und in einem abgedunkelten Gefäß für höchstens drei Tage gelagert.

Für die Negativkontrastierung der TcdA1- bzw. TcdB2-TccC3-Probe wurde ein per Glimmentladung behandeltes mit Kohlenstoff bedampftes Kupfernetz in eine Pinzette gespannt und mit einem 4 µL Tropfen einer 0,05 mg/mL bzw. 0,1 mg/mL TcdA1- bzw. TcdB2-TccC3-Probenlösung für 40 bis 45 Sek. inkubiert. Die überschüssige TcdA1- bzw. TcdB2-TccC3-Probenlösung wurde mit Hilfe eines Filterpapiers entfernt, danach das Kupfernetz mit einem ersten 10 µL Tropfen 0,75 %iger Uranylformiatlösung für eine Sekunde inkubiert, mit Hilfe eines Filterpapiers abgesaugt und schließlich die Proteinprobe mit einem zweiten 10 µL Tropfen 0,75 %ige Uranylformiatlösung für weitere 30 bis 40 Sek. fixiert. Anschließend wurde die überschüssige Uranylformiatlösung mittels eines Filterpapiers entfernt und das Kupfernetz für zwei bis drei Minuten an der Luft getrocknet.

Die Visualisierung der TcdA1- bzw. TcdB2-TccC3-Moleküle erfolgte mit einem Transmissions-elektronenmikroskop (JEM-1400, JEOL GmbH), das bei einer Hochspannung von 120 kV mit einer LaB<sub>6</sub> Kathode als Elektronenquelle betrieben wird. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von TcdA1- bzw. TcdB2-TccC3-Molekülen wurden bei 50k bzw. 60k Vergrößerung und einer minimalen Elektronendosis durchgeführt.

#### 4.2.2 Proteinkristallisation

Bis heute ist die Röntgenkristallographie die verbreitetste und am meisten genutzte Methode, um eine atomar aufgelöste Struktur eines Proteins zu erhalten. Damit diese Methode genutzt werden kann, werden Einkristalle benötigt, die aus hochsymmetrisch angeordneten Proteinen aufgebaut sind. Die Kristallogenie beschreibt die Bildung dieser Einkristalle unter Berücksichtigung mehrerer Parameter. Zu diesen Parametern gehören die

---

Proteinkonzentration, der pH-Wert, die Ionenstärke, die Temperatur, die Proteinqualität sowie Proteinreinheit, die Proteinstabilität und die Präzipitantkonzentration. Auf diese Parameter wird in den folgenden Abschnitten im Detail eingegangen. Eine Zusammenfassung der Proteinvorbereitung und Kristallisationsmethodik geben Dessau & Modis in ihrem ausführlichen Bild- und Videomaterial (Dessau und Modis, 2011).

#### 4.2.2.1 Proteinaufkonzentrierung

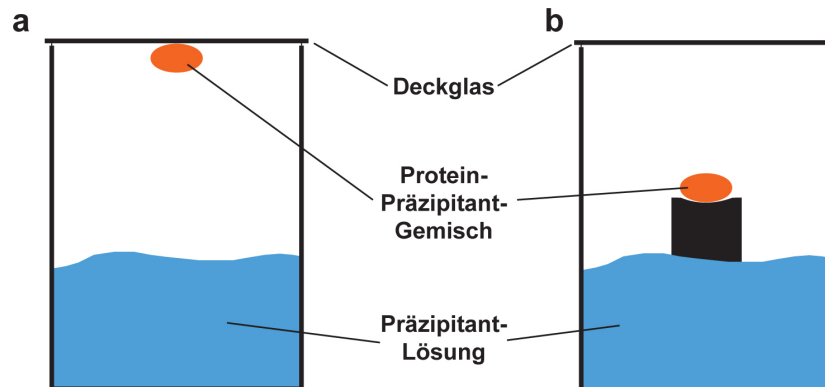
Ein erster Parameter, der die Kristallogeneese von Proteinen beeinflusst, ist die Proteinkonzentration. Diese kann bei der Kristallisation je nach Protein zwischen zwei mg/mL und mehreren hundert mg/mL liegen (Begun et al., 2002; Sobolevsky et al., 2009). Da die Probenfraktionen nach der finalen Größenausschlusschromatographie eine Proteinkonzentration von höchstens 2 mg/mL aufweisen, muss das Probenvolumen mit Hilfe von Konzentratoren eingengt werden, um die Proteinkonzentration zu erhöhen.

Die TcdA1- bzw. TcdB2-TccC3-Proben wurden mittels Konzentratoren (Amicon Ultra-15, Merck Millipore), die ein Ausschlussvolumen von 100 kDa aufweisen, auf eine Endkonzentration von 15 bis 20 mg/mL bzw. 5 bis 10 mg/mL eingengt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über die UV-Absorption bei 280 nm (siehe Abschnitt 4.1.7). Anschließend wurden die eingengten TcdA1- bzw. TcdB2-TccC3-Proben bei 16,000 g für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um unerwünschte Proteinaggregate zu entfernen. Der lösliche eingengte TcdA1 bzw. TcdB2-TccC3-Überstand wurde in ein neues Probengefäß überführt und für die weiteren Kristallisationsexperimente auf Eis gelagert.

#### 4.2.2.2 Kristallisation nach der Dampfdiffusionsmethode

Es gibt verschiedene Methoden, um Proteine zu kristallisieren. Die erfolgreichste und gängigste Methode beschreibt die Proteinkristallisation über Dampfdiffusion (McPherson, 1976). Bei dieser Methode wird zuerst die Proteinlösung mit gleichen Volumina an Präzipitanslösung gemischt. In diesem Schritt wird die Konzentration des Präzipitans halbiert. Gleichzeitig wird ein Reservoir mit einem Überschuss an Präzipitanslösung, die die doppelte Konzentration an Präzipitans enthält, gefüllt. Anschließend wird das Protein-Präzipitansgemisch in hängenden (*hanging drop*) oder sitzenden (*sitting drop*) Tropfen (Abb. 14a und b) über dem Dampfdruck der Präzipitanslösung in einem verschlossenen Gefäß inkubiert. Da sich der Druck im geschlossenen Kristallisationsgefäß aufgrund von Dampfdiffusion über die Zeit ausgleicht, verdunstet Wasser in dem Tropfen des Protein-Präzipitansgemischs, um die höhere

Präzipitanskonzentration der Reservoirolösung zu erreichen. Dadurch erhöht sich die Proteinkonzentration proportional zur Konzentration des Präzipitans und kann von einer stabilen untersättigten Phase in eine labile übersättigte Nukleationsphase übergehen, um von dort über die Zeit in einer metastabilen Phase Kristallwachstum zu ermöglichen (Abb. 15a). Somit verändert die Präzipitanskonzentration über die Zeit die Ionenstärke sowie die Proteinkonzentration und beschreibt einen weiteren Parameter, der die Kristallogeneese beeinflusst.



**Abb. 14: Proteinkristallisation über Dampfdiffusion**

Die Proteinkristallisation über Dampfdiffusion kann (a) nach der *hanging drop* oder (b) nach der *sitting drop* Methode durchgeführt werden.

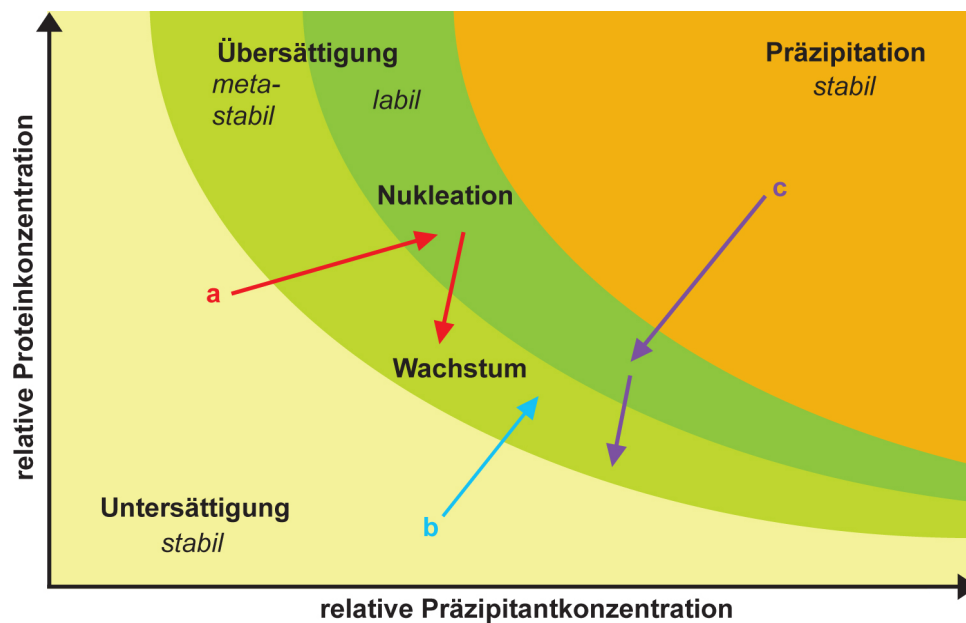
Die Parameter, die die Kristallogeneese beeinflussen, können bei ihrer Optimierung mit Hilfe eines Phasendiagramms beschrieben werden, um Kristallwachstum zu erzielen oder eine Kristallisationsbedingung zu verbessern.

#### 4.2.2.3 Phasendiagramm & Kristallogeneese

Generell werden in einem Phasendiagramm die Zustände eines Objekts bei unterschiedlichen Bedingungen beschrieben. Im Fall der Kristallogeneese über Dampfdiffusion zeigt das Phasendiagramm stabile unter- oder übersättigte Phasen eines Proteins in Lösung, die zu Kristallwachstum in einer metastabilen Phase übergehen können (Saridakis et al., 1994). Dieser Übergang ist zum einen zeitabhängig bzw. abhängig von der Temperatur, zum anderen spielt die Konzentration des Proteins bzw. des Präzipitans eine ausschlaggebende Rolle.

Je nach Protein- bzw. Präzipitanskonzentration bildet sich aus einer stabilen untersättigten Phase (Abb. 15b) direkt Kristallwachstum aus, wohingegen unter bestimmten Bedingungen sich zuerst eine labile Nukleationsphase formt, bevor aus Nukleationskeimen zeitabhängig Kristallwachstum resultieren kann (Abb. 15a). Desweiteren können aus Proteinpräzipitaten

Nukleationskeime entstehen, die auch zeitabhängig zu Kristallwachstum führen können (Abb. 15c).



**Abb. 15: Phasendiagramm des Wachstums eines Proteinkristalls über Dampfdiffusion bei unterschiedlichen Startbedingungen**

Bei der Kristallogeneese kann die Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der Präzipitantkonzentration in einem Phasendiagramm dargestellt werden. Hierbei können (a) beim Übergang von einer stabilen untersättigten in eine labile übersättigte Phase Nukleationskeime entstehen, die über die Zeit in einer metastabilen, übersättigten Phase zu Kristallwachstum führen. Desweiteren kann ein Protein direkt aus (b) einer stabilen untersättigten Phase in einer metastabilen übersättigten Phase kristallisieren, wohingegen (c) das Protein als Präzipitat zuerst Nukleationskeime formt, bevor es zu Kristallwachstum kommt.

Das Phasendiagramm zeigt auch wie zusätzliche Parameter einen großen Einfluss auf die Kristallogeneese haben können. Durch physikalische Parameter, wie z.B. Temperatur, Tropfengröße oder Protein/Präzipitant-Verhältnis kann eine initiale Kristallbildung so weit beeinflusst werden, dass daraus diffraktierende Kristalle entstehen können, die zu einem Datensatz führen und letztendlich zu einer Lösung der Struktur beitragen.

#### 4.2.2.4 Initiale Kristallbildung

Für die initialen Kristallisationsexperimente von TcdA1 und TcdB2-TccC3 wurden sitzende Tropfen nach der Dampfdiffusionsmethode erstellt (Abb. 14b). Hierzu wurden in eine 96-Loch-Kristallisationsplatte, die für sitzende Tropfen konzipiert wurde mit Hilfe eines Pipettierroboters (Mosquito Crystal, TTP Labtech Ltd.) jeweils 100 nL Protein mit 100 nL Kristallisationslösung pro Vertiefung und 75  $\mu$ L Kristallisationslösung pro Reservoir pipettiert. Zuvor wurden die

---

Kristallisationslösungen aus einem 96-Loch-Screening-System (NeXtal Suite, Qiagen GmbH) in die Reservoirvertiefungen der 96-Loch-Kristallisationsplatte mit einem 96-Kanalpipettierer (LIQUIDATOR96, Steinbrenner Laborsysteme GmbH) überführt. Insgesamt wurden zwölf 96-Loch-Screening-Systeme (JCSG Core I bis IV, Classics I und II, MbClass I und II, PEGs I und II, PACT und ProComplex) verwendet. Anschließend wurden alle pipettierten Kristallisationsplatten mit einer Klebefolie luftdicht verschlossen und in einem automatisierten Dokumentationssystem (Rock Imager, Formulatrix, Inc.), das in regelmäßigen Abständen Fotos der Kristallisationstropfen erstellt, bei 20°C gelagert.

#### 4.2.2.5 Optimierung von Kristallisationsbedingungen

Die initialen Kristallisationsbedingungen der TcdA1- (Classics II, Bedingung C9 und JCSG Core III, Bedingung B2) und TcdB2-TccC3-Kristalle (MbClass I, Bedingung G6 und MbClass II, Bedingung F1) wurden nach der *hanging drop* Dampfdiffusionsmethode reproduziert (Abb. 13a). Hierfür wurden zuerst die oberen Umrundungen der 24-Loch-Platte-Reservoirs mit Silikonpaste präpariert und anschließend die Reservoirs mit jeweils 500 µL TcdA1-Kristallisationspuffer I bzw. II sowie TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer I bzw. II gefüllt. TcdA1 wurde für ein Endtropfenvolumen von 6 µL mit TcdA1-Kristallisationspuffer I bzw. II im Verhältnis 1:1, 2:1 und 1:2 auf einem runden Deckglas gemischt. Hierzu wurde der TcdA1-Proteintropfen auf dem Deckglas vorgelegt und das jeweilige Volumen an Kristallisationspuffer, das einem Protein-Puffer-Verhältnis von 1:1, 2:1 bzw. 2:1 entspricht, hinzupipettiert. Anschließend wurde das Deckglas umgedreht liegend mit Hilfe der Silikonpaste auf dem oberen Rand des jeweiligen Reservoirs fixiert und die 24-Loch-Platte bei 20°C erschütterungsfrei gelagert.

#### 4.2.2.6 Herstellung von Schwermetall-derivatisierten Proteinkristallen

Da kein zu TcdB2 und TccC3 homologes Modell existiert, um deren Strukturen über molekularen Ersatz zu lösen, müssen diffraktierende Schwermetall-derivatisierte TcdB2-TccC3-Kristalle generiert werden. Hierbei sollen die Schwermetalle spezifisch bzw. unspezifisch an die Seitenketten des zu untersuchenden Proteins im Proteinkristall binden. Als Beispiel binden Quecksilber bzw. Platin kovalent an Thiolgruppen von Cysteinen (Agniswamy et al., 2008) bzw. Thioethergruppen von Methioninen oder den Imidazolring von Histidinen (Boggon et al., 2000), wohingegen Schwermetallcluster (z.B. Ta<sub>6</sub>Br<sub>12</sub>), die eine starke anomale Streuung aufweisen, proteinabhängig an bestimmten Stellen des Proteins interagieren (Knablein et al., 1997). Mit

Hilfe der Schwermetalle wird bei der Wellenlänge, bei der das Schwermetall ein Absorptionsmaximum aufweist, anomale Dispersion genutzt (Kartha, 1965). Mit diesen Signalen können über die Pattersonfunktion die Positionen der Schweratome ermittelt werden (Drenth und Mesters, 2007). Die Strukturfaktoren aller Atome werden über die Berechnung einer Differenz-Pattersonkarte bestimmt und führen letztendlich zur Berechnung der Phasen, die für die Ermittlung der röntgenkristallographischen Elektronendichte des zu untersuchenden Biomoleküls benötigt werden.

**Tab. 7: Schwermetallverbindung für die Schwermetallderivatisierung von TcdB2-TccC3-Kristallen**

<b>Schwermetallderivat</b>	<b>Summenformel</b>	<b>Molekulargewicht (g/mol)</b>
Thiomersal (Natriumethylmercurithiosalicylat)	$C_9H_9HgNaO_2S$	404,81
Di-Kaliumtetraniroplatinat (II)	$K_2Pt(NO_2)_4$	457,30
Di-Kaliumtetrachloroplatinat	$K_2PtCl_4$	415,09
Diiodobisethylendiamin-di-platinum(II)nitrat (PIP)	$C_4H_{16}I_2N_6O_6Pt_2$	888,17
Mersalylsäure	$C_{13}H_{17}HgNO_6$	483,87
p-Chloromercuribenzen-sulfonat (PCMBS)	$C_6H_4ClHgO_3S$	415,19

Für eine Bestimmung der TcdB2-TccC3-Elektronendichte wurden verschiedene Quecksilber- (Hg) und Platin- (Pt) Derivate getestet, die aufgrund ihrer hohen Ordnungszahl relativ starke anomale Signale hervorrufen (Tab. 7). Alle Hg- und Pt-Derivate wurden in TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer I in einer Endkonzentration von 1 mM gelöst. Anschließend wurden diese Lösungen 1:10 in TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer I verdünnt. In einer 24-Loch-Kristallisationsplatte wurden pro Reservoir 500  $\mu$ L TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer I vorgelegt und die Umrandungen der Reservoirs mit Silikonpaste präpariert. Von jeder Schwermetalllösung wurden je Konzentration 2  $\mu$ L pro Deckglas pipettiert. In jeden Tropfen wurden ein bis zwei TcdB2-TccC3-Kristalle überführt und das jeweilige Deckglas umgedreht liegend mit Hilfe der Silikonpaste auf dem oberen Rand des jeweiligen Reservoirs fixiert. Die TcdB2-TccC3-Kristalle wurden in der Schwermetalllösung für vier bis sechs Stunden inkubiert und anschließend für weiterführende Röntgenbeugungsexperimente kryokonserviert.



---

### 4.2.3 Proteinkristall-Kryokonservierung

Weil in den Anfangszeiten der Proteinkristallographie die Röntgenbeugungsexperimente bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, musste aufgrund von immensen Strahlungsschäden eine große Anzahl an Proteinkristallen für die Generierung eines kompletten Datensatzes gezüchtet werden (Owen et al., 2006). Die Einführung von Röntgenbeugungsexperimenten bei niedrigen Temperaturen (z.B. 100 Kelvin) reduzierte Strahlungsschäden, jedoch führten Gefrierschäden aufgrund von mechanischer Belastung zu einer stark veränderten Ordnung der Proteine im Kristall (Low et al., 1966). Damit Strahlungsschäden an Proteinkristallen so gering wie möglich gehalten werden können, wurden neue Methoden der Kryokonservierung von Proteinkristallen erforscht (Hope, 1988). Durch Verwendung von Chemikalien, die unter kryogenen Bedingungen das Kristallgitter nicht verändern, konnten komplette Datensätze an einem Kristall gemessen werden. Neben niedermolekularen Polyethylenglykolen (PEG) und Alkoholen ist Glycerin das erfolgreichste Kryoschutzmittel, um Proteinkristalle zu kryokonservieren (Garman und Owen, 2007).

Für die Kryokonservierung von TcdA1- bzw. TcdB2-TccC3-Kristallen wurden PEG 400 und Glycerin verwendet. Hierzu wurde TcdA1-Kristallisationspuffer I bzw. TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer I mit jeweils 5, 10, 15, 20, 25 und 30 % PEG 400 bzw. Glycerin als Endkonzentration in 2 mL Reaktionsgefäßen angesetzt. Anschließend wurde deren kryoprotektierendes Verhalten an der hausinternen Röntgenquelle (MICROSTAR, Bruker AXS, Inc.) ermittelt. Dafür wurden die Lösungen nacheinander mit einer Kristallschleife aufgenommen, für eine Minute bestrahlt und das Auftreten von Eisringen auf den Röntgenbeugungsbildern beobachtet. Bilden sich keine Eisringe aus, ist die Probe optimal kryokonserviert.

Im weiteren Verlauf wurden auf runde Deckgläser nebeneinander 2 µL Tropfen mit ansteigender PEG 400 bzw. Glycerinkonzentration pipettiert. Die reproduzierten TcdA1-Kristalle und die Schwermetall-derivatisierten TcdB2-TccC3-Kristalle wurden in einer passenden Kristallschleife aufgenommen, sofort in den Kryokonservierungspuffer mit der geringsten PEG 400 bzw. Glycerinkonzentration überführt und solange in die Puffer mit der nächst höheren Konzentration eingetaucht, bis der Puffer mit der finalen Konzentration erreicht wurde. Im letzten Schritt wurden die Kristalle in der Kristallschleife in kürzester Zeit in flüssigem Stickstoff eingefroren und an einer hausinternen Röntgenquelle auf Röntgenbeugung getestet.

---

#### 4.2.4 Datenaufnahme und -prozessierung

##### 4.2.4.1 Röntgenbeugungsexperimente an hausinternen Kupferdrehanodenröntgenquellen

Die ersten Röntgenbeugungsexperimente von TcdA1- bzw. TcdB2-TccC3-Kristallen wurden an hausinternen Röntgenquellen (MICROSTAR, Bruker AXS, Inc.), die jeweils mit einem 2D-Flächendetektor (mar345, Marresearch GmbH) ausgestattet sind, unter kryogenen Bedingungen vollzogen. Für jedes Experiment wurde ein Kristall in einer Kristallschleife auf einem Goniometerkopf montiert und mit Hilfe des Goniometers im Röntgenstrahl zentriert. Anschließend wurden vier 15 minütige Aufnahmen jedes Kristalls durchgeführt, wobei zwischen jeder Messung der Kristall um 90° gedreht wurde. Die Röntgenbeugungsbilder wurden auf Trennung der Beugungsreflexe hin überprüft und im weiteren Verlauf mit dem Programm Mosflm integriert, um Informationen über Einheitszellausmaße, Raumgruppe, Kristallordnung etc. zu erhalten (Leslie, 1999). Streuende Kristalle wurden für weitere Röntgenbeugungsexperimente mittels Synchrotronstrahlung in flüssigem Stickstoff gelagert.

##### 4.2.4.2 Röntgenbeugungsexperimente mittels Synchrotronstrahlung

Alle finalen Röntgenbeugungsexperimente wurden mittels Synchrotronstrahlung an der Strahllinie PXII-X10SA des Teilchenbeschleunigers am Paul-Scherrer-Institut (Villigen, Schweiz) durchgeführt. Die Röntgenbeugungsdatensätze der TcdA1-Kristalle wurden von mir und die Datensätze der TcdB2-TccC3-Kristalle von Frau Dr. Ingrid Vetter gemessen.

Die Messungen der TcdA1-Kristalle (A-, B- bzw. C-Kristall) wurden bei einer Wellenlänge von 0,9793 Å für den A-Kristall durchgeführt. Sechs nicht komplette Datensätze wurden mit einem 20 µm fokussierten Strahl an versetzten Stellen des A-Kristalls (Belichtungszeit: 1 Sekunde; Energie:  $9 \times 10^{11}$  Photonen/Sekunde) überlappend aufgenommen, um die besten Röntgenbeugungsbilder in einem finalen kompletten Datensatz zu vereinen. Die Röntgenbeugungsexperimente am B- bzw. C-Kristall wurden bei einer Wellenlänge von 1,0000 Å mit einem 20 µm fokussierten Strahl (Belichtungszeit: 1 Sekunde; Energie: 5 bzw.  $9 \times 10^{11}$  Photonen/Sekunde) durchgeführt.

Die Röntgenbeugungsdatensätze der Quecksilber-bzw. Platin-derivatisierten TcdB2-TccC3-Kristalle wurden mit einem 150 µm fokussierten Strahl bei den Wellenlängen 1,00717 Å bzw. 1,07169 Å redundant (720°) aufgenommen, um ein mögliches anomales Signal zu verstärken.

---

Für jeden diffraktierenden derivatisierten TcdB2-TccC3-Kristall wurden zwei Datensätze bei unterschiedlichen Energien gemessen (Belichtungszeit: 0,1 Sekunde; Energien:  $2,5 \times 10^{11}$  und  $1 \times 10^{12}$  Photonen/Sekunde). Alle Röntgenbeugungsdatensätze bzw. Röntgenbeugungsbilder wurden im weiteren Verlauf auf Datenqualität überprüft sowie prozessiert.

#### 4.2.4.3 Prozessierung von Röntgenbeugungsexperimenten

Die Röntgenbeugungsdatensätze der TcdA1-Kristalle wurden in XDS indiziert und integriert (Kabsch, 2010). Die Datensätze des A-Kristalls wurden nach Bildern mit Bereichen bester Auflösung durchsucht, um diese in einem kompletten Datensatz zu vereinen. Anschließend wurden diese Bilder mit dem Programm Scala (Evans, 2006) des CCP4 Programmpakets (Collaborative Computational Project, 1994) skaliert und die Intensitäten aller Datensätze gemittelt. Desweiteren wurden über die Intensitäten des Datensatzes mit dem Programm Truncate (Winn et al., 2011) des CCP4 Programmpakets die Strukturfaktoramplituden berechnet und alle Faktoren in einem Datensatz zusammengefügt. Zusätzlich wurde der Datensatz mit Hilfe des Anisotropie-Servers anisotropisch korrigiert (Strong et al., 2006). Es wurden Bereiche, die keine Röntgenbeugung aufweisen, entfernt und der Datensatz nochmals skaliert und die Strukturfaktoren korrigiert. Der B- und der C-Kristall wurden nach Indizierung und Integration in XDS skaliert und die Strukturfaktoramplituden mit Truncate für eine nachfolgende Strukturbestimmung extrahiert (Kabsch, 2010).

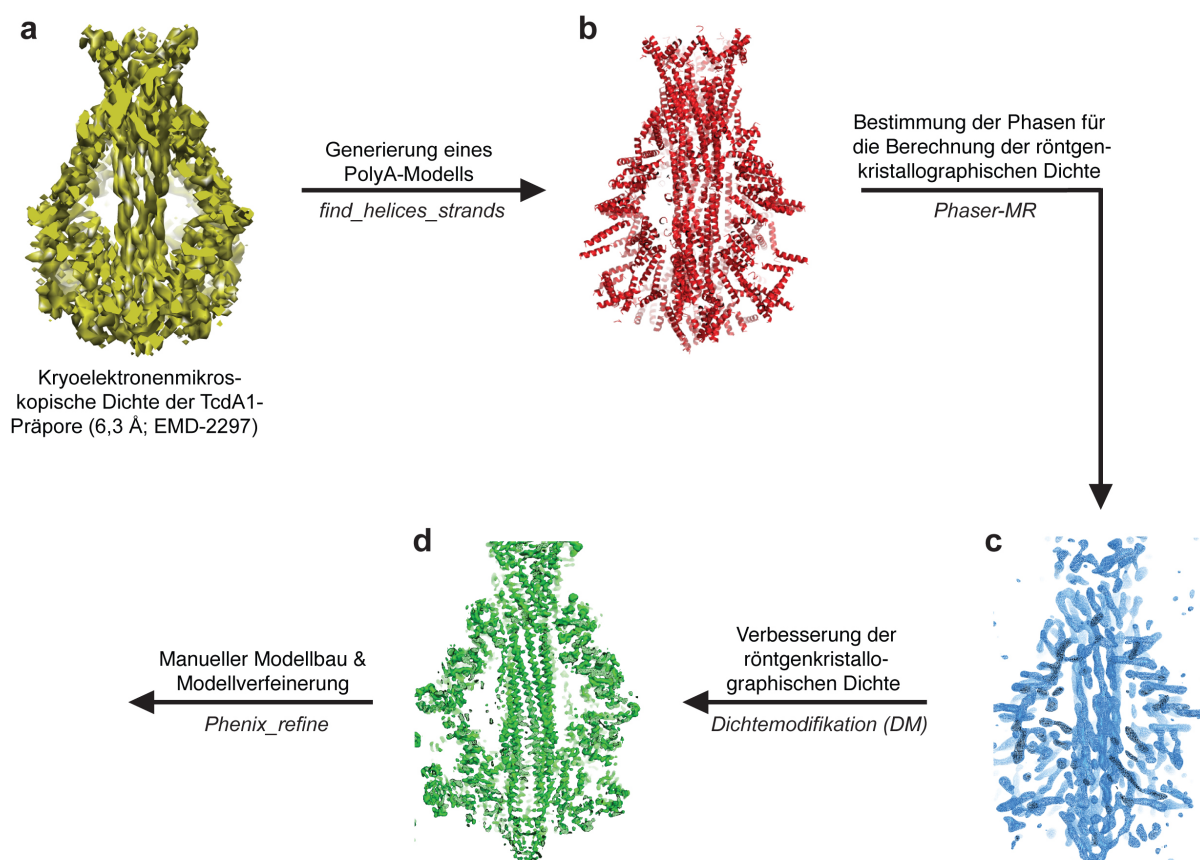
Für die Prozessierung der Röntgenbeugungsexperimente der TcdB2-TccC3-Kristalle wurden zu Anfang alle Datensätze im Programmpaket XDS indiziert und integriert. Anschließend wurden in der Logbuch-Datei (CORRECT.LP) die Intensitäten auf einen anomalen Unterschied (AnomalCorr und SigAno) überprüft. Dieser Unterschied gibt einen ersten Hinweis für das Vorhandensein eines anomalen Signals. Im weiteren Verlauf wurden die Intensitäten im Programmpaket XDS mit dem Programm XSCALE skaliert und anschließend mit dem Programm XDSCONV in Strukturfaktoramplituden konvertiert (Kabsch, 2010). Insgesamt wurden von sechs Schwermetall-derivatisierten TcdB2-TccC3-Kristallen jeweils zwei redundante Röntgenbeugungsdatensätze gemessen. Die zwei Datensätze wurden auf der Ebene der Vollständigkeit, des R-Faktors, des anomalen Unterschieds und der höchsten Auflösung miteinander verglichen. Für weitere experimentelle Phasierungsexperimente wurden alle Röntgenbeugungsdatensätze der Schwermetall-derivatisierten TcdB2-TccC3-Kristalle

verwendet, um im weiteren Verlauf die Wahrscheinlichkeit für einen erfolgreichen experimentellen Phasierungsansatz zu erhöhen.

## 4.2.5 Strukturbestimmung

### 4.2.5.1 Phasierung von Röntgenbeugungsdatensätzen über molekularen Ersatz (MR)

Um die richtigen Phasen für die Berechnung der TcdA1-Elektronendichte über die Methode des molekularen Ersatzes zu erhalten, wird ein Modell eines homologen Proteins benötigt (Arnold und Rossmann, 1986). Da dieses Modell so ähnlich wie möglich sein sollte, erstellte Herr Dr.



**Abb. 16: Flussdiagramm der TcdA1-Strukturbestimmung über molekularen Ersatz**

Mit Hilfe der (a) kryoelektronenmikroskopischen Dichte der TcdA1-Präpore (EMD-2297) wurde bei einer Auflösung von 6,3 Å in *find\_helices\_strands* ein (b) Polyalaninmodell generiert. Mittels dieses Modells wurden in *Phaser-MR* die experimentellen Phasen für die (c) Berechnung der röntgenkristallographischen Elektronendichte bestimmt. Diese Elektronendichte wurde über Verfeinerung der Phasen mittels *solvent flattening* und *NCS averaging* in DM bearbeitet und führte zu (d) einer verbesserten kontinuierlichen Elektronendichte mit einer Auflösung von 3,5 Å.

Christos Gatsogiannis ein Polyalaninmodell (Abb. 16b) der kryoelektronenmikroskopischen Dichtekarte (Abb. 16a) der TcdA1-Präpore (EMD-2297) mit dem Programm

---

*find\_helices\_strands* (Terwilliger, 2010) des PHENIX Programmpakets (Adams et al., 2010). Dieses Polyalaninmodell wurde verwendet, um mit Hilfe Patterson-basierter Methoden über Rotations- funktionen und zusätzlich Translationsfunktionen die beste Korrelation zwischen Suchmodell und unbekanntem Modell zu finden (Toth, 2007).

Die korrekten Phasen, die zur Berechnung der röntgenkristallographischen Elektronendichte von TcdA1 benötigt werden, wurden mit dem Programm Phaser-MR (McCoy et al., 2007) des PHENIX Softwarepakets (Adams et al., 2010) bestimmt. Die Darstellung und Validierung der korrekten Elektronendichte (Abb. 16c) erfolgte in dem Programm Coot (Emsley et al., 2010).

#### **4.2.5.2 Verbesserung der experimentellen Elektronendichtekarte (*Solvent Flattening* und *NCS Averaging*)**

Die auf Basis des molekularen Ersatzes bestimmten Phasen für die Berechnung der Elektronendichte von TcdA1 sollen über Dichtemodifikationsmethoden verbessert werden. Eine Dichtemodifikation wird durchgeführt, da die meisten experimentell oder durch molekularen Ersatz bestimmten Phasen nicht eindeutig genug sind, um aus ihnen eine korrekte kontinuierliche Elektronendichte zu berechnen. Die Methode des *Solvent Flattening* reduziert die Elektronendichte, die nicht zu der berechneten Elektronendichte des Proteins beiträgt (Wang, 1985). Dadurch wird das Signal zu Rausch-Verhältnis erheblich verbessert und die Elektronendichte des Proteins präziser dargestellt. Die Methode des *NCS Averaging* kann zu einer Verbesserung der Phasen bzw. der Elektronendichte beitragen, wenn der oligomere Zustand des Proteins und bzw. oder die nicht-kristallographische Symmetrie der asymmetrischen Einheit bekannt sind (Rossmann, 1995). Eine interne Symmetrie im Protein und eine Symmetrie der Proteine in der asymmetrischen Einheit führen nach Mittelung zu verringertem Hintergrundrauschen sowie zu exakteren Phasen und dadurch zu einer verbesserten Elektronendichte.

Für eine Verbesserung der Elektronendichte mittels *Solvent Flattening* und *NCS Averaging* wurde zuerst der Lösemittelinhalt der Einheitszelle über den Matthews-Koeffizienten mit dem Programm *Matthews\_coeff* (Kantardjieff und Rupp, 2003) des CCP4 Programmpakets und dem Molekulargewicht der TcdA1-Präpore bestimmt. Anschließend wurden die Phasen bzw. wurde die Elektronendichte mit dem zugehörigen Wert des Lösemittelinhalts in dem Programm DM (Baker et al., 1993) des CCP4 Programmpakets optimiert. Bei den Berechnungen wurde der Lösemittelinhalt +/- 20 % in 5 % Schritten verändert, um eine Verbesserung bzw.

Verschlechterung der optimierten Elektronendichte zu ermitteln und dadurch den optimalen Lösemittelinhalt zu bestimmen.

Nach Verbesserung der Phasen bzw. der Elektronendichte wurde mit dem Programm NCSmask des CCP4 Programmpakets eine 5 Å breite Maske des TcdA1-Polyalaninmodells erstellt, um aufgrund eines kleineren Suchbereichs das Hintergrundrauschen noch mehr zu verringern und dadurch die Phasen verbessern zu können. Wenn keine Verbesserung der Elektronendichte möglich war, wurde diese (Abb. 16d) für den initialen Modellbau der TcdA1-Präpore verwendet.

#### **4.2.5.3 Experimentelle Phasierung nach der *Single Wavelength Anomalous Dispersion (SAD)* Methode**

Für die Bestimmung der Strukturen aus den in Abschnitt 4.2.4.3 prozessierten Röntgenbeugungsdatensätzen der Schwermetall-derivatisierten TcdB2-TccC3-Kristalle wurden zuerst die Koordinaten der Quecksilber- bzw. Platin-Schweratome mit dem Programm Autosol (Terwilliger et al., 2009) des Phenix Programmpakets lokalisiert bzw. berechnet. Anschließend wurden die experimentellen Phasen über das in Autosol integrierte Programm Phaser-EP (McCoy et al., 2004) berechnet und die ermittelten Phasen bzw. die Elektronendichte über Dichtemodifikation mit dem integrierten Programm RESOLVE (Terwilliger, 2000) verbessert. RESOLVE baute bei einer wahrscheinlichen Lösung ein erstes Modell des Proteins, das in einem finalen Schritt mit dem integrierten Programm phenix.refine (Afonine et al., 2012) verfeinert wurde.

#### **4.2.5.4 Automatischer und manueller Modellbau sowie Modellverfeinerung**

Ein Polyalaninmodell eines TcdA1-Protomers wurde in die mittels DM verbesserte TcdA1-Elektronendichtekarte von Herrn Dr. Rouslan Efremov mit dem Programm O (Jones, 1978) gebaut und im weiteren Verlauf mit dem Programm Coot (Emsley et al., 2010) und den Aminosäureresten der TcdA1-Sequenz komplettiert. Das TcdA1-Pentamer konnte aufgrund seiner Fünffachsymmetrie mit einer Symmetrioperation (Drehmatrize) aus dem TcdA1-Protomer aufgebaut werden. Die Verfeinerung des TcdA1-Pentamers erfolgte in fünf Verfeinerungsschritten mit dem Programm phenix.refine des Phenix Programmpakets. Der Modellbau war abgeschlossen, wenn eine Verbesserung der R-Faktoren nicht mehr möglich war und – wenn möglich – alle Aminosäurereste in den bevorzugten geometrischen Konformationen des Ramachandranplots auftraten (Ramachandran et al., 1963).

---

Nach den ersten Verfeinerungszyklen des TcdB2-TccC3-Modells mit dem Programm Autosol wurde das Atommodell von mir zum Teil manuell in dem Programm Coot gebaut. Im weiteren Verlauf wurde das Modell mit dem Programm Buccaneer (Cowtan, 2006) des CCP4 Programmpakets komplettiert, manuell validiert und über mehrere iterative Zyklen mit dem Programm phenix.refine (Afonine et al., 2012) des Phenix Programmpakets verfeinert.

Die finalen Modelle von TcdA1 bzw. TcdB2-TccC3 wurden mit den Programmen MolProbity (Davis et al., 2007), PROCHECK (Laskowski et al., 1996) und SFCHECK (Vaguine et al., 1999) validiert, bevor sie für die nachfolgende Strukturanalyse verwendet wurden.

#### **4.2.6 Strukturanalyse**

Nachdem die röntgenkristallographischen Modelle von TcdA1 und TcdB2-TccC3 automatisch bzw. manuell verfeinert worden waren und eine weitere Verbesserung der Elektronendichte nicht mehr möglich war, wurden die Modelle strukturbiochemisch analysiert. Diese Analyse umfasste die Identifizierung und Zuordnung von Domänen bzw. Strukturelementen, den Vergleich dieser mit bekannten Proteinstrukturen auf Basis von Sequenz- und Strukturähnlichkeiten, die Identifizierung von inter- und intramolekularen Interaktionsflächen, die Vorhersage von Kanälen bzw. Poren bzw. deren Simulation in einer künstlichen Lipiddoppelschicht, die sequenz- und strukturbasierte Konservierung von Aminosäuren, das Oberflächenhydrophobizitätsprofil und die struktur- und sequenzbasierte Vorhersage von unterschiedlichen pH-abhängigen Protonierungszuständen.

##### **4.2.6.1 Identifizierung und Zuordnung von Domänen und Strukturelementen**

Zur Identifizierung von Domänen bzw. Strukturelementen wurde ein TcdA1-Protomer sowie ein TcdB2-TccC3-Heterodimer in UCSF Chimera dargestellt (Pettersen et al., 2004) und anschließend in Bereiche mit definierten Tertiärstrukturen segmentiert. Anschließend wurden die Segmente in Domänen untergliedert, in denen Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter gehäuft auftreten und diese Elemente zusätzlich eine definierte Tertiärstruktur (z.B. parallel oder antiparallel verlaufende  $\beta$ -Faltblätter) einnehmen. Ein weiteres Indiz für eine eigenständige Domäne ist eine räumliche Nähe von N- und C-Terminus in einer Tertiärstruktur bei einer definierten Faltung.

---

#### 4.2.6.2 Vergleich von Domänen und Strukturelementen mit bekannten Proteinstrukturen

Mit den in Abschnitt 4.2.6.1 definierten Domänen wurde mit Hilfe des Dali Programms nach strukturellen homologen Proteinen gesucht (Holm und Rosenstrom, 2010). Dieses Programm vergleicht die Suchmodelle mit bekannten Strukturen der pdb-Datenbank und sucht anschließend in den Nachbarschaften von identifizierten homologen Strukturen (Nachbarn), um die Ähnlichkeiten einzugrenzen. Bei der Auswertung der Ergebnisse beschreibt der Z-Score die strukturelle Ähnlichkeit zu möglichen homologen Proteinen. Dieser Wert sollte möglichst hoch bzw. größer als zwei sein, da ein niedrigerer Wert ein falsch-positives Ergebnis suggerieren würde. Neben dem Z-Score (Z) wurde die mittlere quadratische Abweichung (rmsd) des Strukturvergleichs sowie die Sequenzähnlichkeit (%id) in dem alignierten Bereich (lali) der Gesamtstruktur (nres) betrachtet, um eine Konvergenz bzw. Divergenz in der Faltung des Suchmodells zu den homologen Strukturen zu erhalten.

Desweiteren wurde ein Topologiediagramm jeder definierten Domäne mit dem Programm ProFunc generiert (Laskowski et al., 2005) und mit den Topologien der homologen Strukturen verglichen. Bei homologen Strukturen mit identischen oder ähnlichen Faltungen wurde in der SCOP Datenbank (Andreeva et al., 2008) eine Klassifizierung dieser Proteine überprüft und deren Funktion mit den möglichen Funktionen der TcdA1- und TcdB2-TccC3-Domänen diskutiert.

Die definierte Domäne und zwei homologe Strukturen wurden in UCSF Chimera aligniert (Pettersen et al., 2004) und zusammen mit dem zugehörigen Topologiediagramm der Domäne dargestellt.

#### 4.2.6.3 Untersuchung möglicher Interaktionsflächen von Domänen sowie von Protomeren eines Oligomers

Zur Identifizierung der Interaktionsfläche zweier TcdA1-Protomere, der Interaktionsfläche von TcdB2 und TccC3 sowie der in Abschnitt 4.2.6.1 definierten Domänen wurde der PDBePISA Webserver verwendet (Krissinel und Henrick, 2007). Dieser Webserver nutzt einzelne Domänen bzw. Strukturen eines röntgenkristallographischen Modells, um die Stabilität der Bildung des Modells aus diesen Strukturen zu bestimmen. Hierbei wird für die Stabilität eines Komplexes die Interaktionsfläche der einzelnen Strukturen, deren Ausbildung von Wasserstoff- bzw. Salzbrücken sowie der Gewinn an freier Energie berücksichtigt.



---

Die einzelnen Domänen bzw. Protomere wurden in UCSF Chimera in einem pdb-Dokument zusammengefügt, um deren Interaktionsfläche zu bestimmen. Hierbei müssen die Aminosäureketten der Domänen bzw. Protomere bzw. Proteine mit unterschiedlichen Kennungen (A, B, C etc.) versehen werden, um ein Interaktionsflächenprofil zu erzeugen. Die Anzahl der interagierenden Reste, die Lösemittel zugängliche Interaktionsfläche, die Anzahl an Wasserstoff- bzw. Salzbrücken und die freie Solvatationsenergie wurden getrennt für jeden Interaktionsbereich tabellarisch zusammengefasst. Die Aminosäuren, die die jeweilige Interaktionsfläche bilden, wurden als eine zusammenhängende Oberfläche für jedes Protomer getrennt in UCSF Chimera dargestellt. Zusätzlich wurden die interagierenden Oberflächen bzw. die einzelnen Aminosäuren nach ihrem elektrostatischen Coloumbpotential (-12 bis +12 kcal/mol) und einer festen Farbskala (von rot über weiß nach blau) in UCSF Chimera dargestellt.

#### **4.2.6.4 Vorhersage von Kanälen und Poren auf Basis einer Proteinstruktur**

Die Form, der Durchmesser sowie die porenbildenden Aminosäuren des Translokationskanals (AS 2016-2327) der TcdA1-Präpore wurden mit dem Programm PoreWalker ermittelt (Pellegrini-Calace et al., 2009). PoreWalker beschreibt eine automatisierte Methode, die zuerst nach Transmembranbereichen in Proteinen sucht, um im weiteren Verlauf mit Hilfe von Aminosäuren, die in die Pore bzw. den Kanal ragen, das Zentrum sowie die Mittelachse der Pore bzw. des Kanals zu berechnen. Aufgrund von Geometrieparametern wird das Zentrum bzw. die Achse verfeinert und soweit maximiert, damit im finalen Schritt der Kanalinnenraum über dessen Innendurchmesser sowie porenbildender Aminosäuren definiert werden kann. Die Form der Pore bzw. des Kanals wird in horizontalen Schritten alle 3 Å gemessen und deren Veränderung graphisch festgehalten.

Der Innendurchmesser des TcdA1-Translokationskanals wurde durch manuelles Ausmessen in USCF Chimera mit den von PoreWalker generierten Ergebnissen verglichen, verifiziert und anschließend graphisch dargestellt.

#### **4.2.6.5 Moleküldynamiksimulation eines Proteinmembranmodells**

Mit Hilfe des CHARMM-GUI Webservers (Jo et al., 2009) wurde die TcdA1-Transmembranregion (AS 2104-2190) in einer homogenen DOPC-Lipiddoppelschicht simuliert. Hierbei wurde die GUI des Programms Membrane Builder (Jo et al., 2007) verwendet, um eine individuelle DOPC-Lipiddoppelschicht bestehend aus 342 DOPC-Molekülen mit den Ausmaßen 115 Å x

---

115 Å x 18 Å zu generieren. In diese Membran wurde mit Hilfe des Programms CHARMM (Brooks et al., 2009) die TcdA1-Transmembranregion, die zuvor in einer wässrigen Umgebung simuliert wurde, eingebettet und in einem finalen Schritt ein komplettes Protein-Membranmodell erstellt. Das finale Protein-Membranmodell wurde mit dem Programm UCSF Chimera visualisiert.

#### **4.2.6.6 Sequenzbasierte Homologiedarstellung von Proteinstrukturen aufgrund evolutionärer Konservierung**

Für die Darstellung des TcdA1- und TcdB2-TccC3-Modells sowie bestimmter Domänen nach dem Grad der Aminosäurekonservierung wurde zuerst nach ähnlichen Proteinen auf Sequenzbasis mit dem Programm BLASTp gesucht (Altschul et al., 1990). Nach Auswahl von 15 bis 20 Aminosäuresequenzen ähnlicher Proteine wurden diese mit dem Programm CLUSTALW2 aligniert (Larkin et al., 2007). Die daraus resultierende CLUSTALW-Sequenzalignierungsdatei wurde zusammen mit der zugehörigen pdb-Datei von TcdA1 oder TcdB2 bzw. TccC3 verwendet, um mit dem Programm ConSurf (Ashkenazy et al., 2010) anhand der Sequenzalignierung konservierte Bereiche farblich zu markieren. Diese Bereiche sowie die zugehörige Sequenzalignierung wurden über eine chimerax-Datei in UCSF Chimera aufgerufen, farblich variabel dargestellt und ausgewertet.

#### **4.2.6.7 Hydrophobizitätsanalyse nach Hessa & Heijne**

Die klassische Hydropathieskalierung eines Proteins nach Kyte & Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) kann auf lösliche, jedoch nicht auf membranständige Proteine angewandt werden. Letztere Proteine zeigen eine viel komplexere Anordnung von polaren und unpolaren Bereichen in einer Lipiddoppelschicht. Daher variiert die Zuordnung eines Hydropathiewertes bei Aminosäuren, die in der Membran liegen, im Vergleich zu Aminosäuren, die der Oberfläche exponiert auftreten (Hessa et al., 2005). Da die Transmembranregion von TcdA1 die Lipiddoppelschicht penetriert, ist eine Hydrophobizitätsanalyse nach Hessa & Heijne die beste Wahl. Hierfür wurde jeder Aminosäure über eine txt-Datei ein spezifischer Hydropathiewert zwischen -0,6 und +3,5 zugeordnet und die Oberfläche des jeweiligen Proteins nach einer Farbskala (von ockergelb bis weiß) in UCSF Chimera dargestellt.

---

#### 4.2.6.8 Strukturbasierte Vorhersage von Protonierungszuständen bei unterschiedlichen pH-Werten

Der Protonierungszustand von TcdA1, TcdB2 und TccC3 bei pH 7,5 wurde mit Hilfe des Programm H++ bestimmt (Anandakrishnan et al., 2012). H++ berechnet die theoretischen pKa-Werte von ionisierbaren, d.h. geladenen, sauren oder basischen Aminosäureresten anhand des gegebenen pH-Wertes der Umgebung und fügt je nach Protonierungszustand fehlende Wasserstoffatome der pdb-Datei hinzu (Bashford und Karplus, 1990). Zusätzlich wurde bei einer typischen physiologischen Umgebung die externe Dielektrizitätskonstante des Wassers von 80 und eine Salzkonzentration von 0,15 M berücksichtigt, um eine kontinuierliche Lösemittelbedingung nachzuahmen. Die interne Dielektrizitätskonstante wurde bei Berechnung der Protonierungszustände von TcdA1, TcdB2 und TccC3 mit einem Wert von 10 verwendet, um hauptsächlich eine Veränderung der Protonierungszustände von exponierten Aminosäureresten erkennen zu können. Die Protonierungszustände des Neuraminidase-ähnlichen Pentamers (AS 1091-1307, 1581-1607) wurden bei pH 4, pH 7 und pH 11 mit Hilfe des Programm H++ bestimmt. Die Oberflächen der analysierten Strukturen wurde nach dem elektrostatischen Coloumbpotential (-12 bis +12 kcal/mol) und einer festen Farbskala (von rot über weiß nach blau) in UCSF Chimera dargestellt.



---

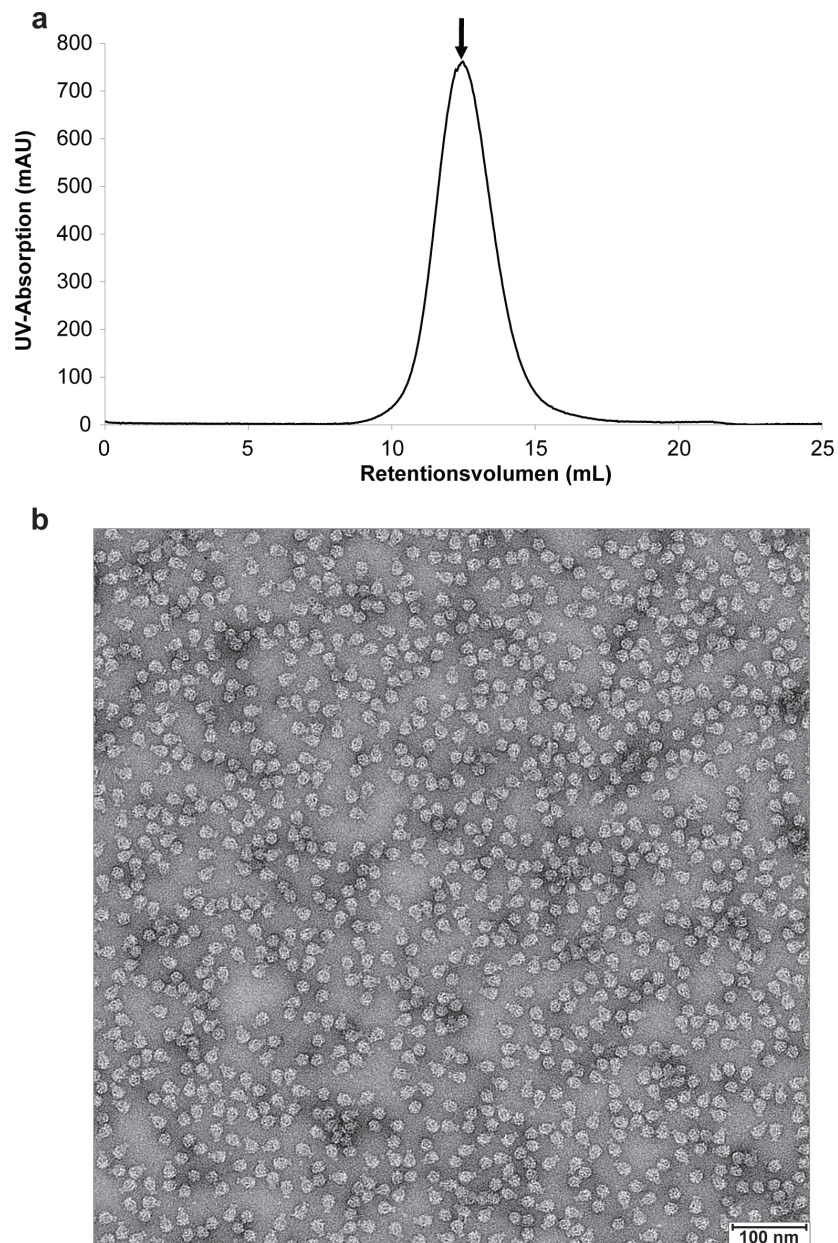
## 5 ERGEBNISSE & DISKUSSION

### 5.1 TcdA1-Präpore

Für alle durchgeführten Experimente wurde über Ni-NTA aufgereinigtes TcdA1 von Dr. Alexander Lang, Universität Freiburg, in gefrorenem Zustand zur Verfügung gestellt und nach dem Auftauen zusätzlich mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, nach Reinigung von TcdA1 mittels einer Superose 6 Gelfiltrationssäule bei pH 8 in TcdA1-SEC-Puffer, einen erheblichen Anteil an TcdA1-Aggregaten, wodurch die Vermutung nahe lag, dass die Pufferbedingungen nicht optimal gewählt waren (Gatsogiannis et al., 2013). Eine Änderung des pH-Wertes über mehrere Dialyseschritte führte zu einem Gelfiltrationsprofil mit einem rein monodispersen Kurvenverlauf (Abb. 17a) bei pH 5 in TcdA1-SEC-Puffer II. Elektronen-mikroskopische Aufnahmen einer negativkontrastierten TcdA1-Probe (Abb. 17b) zeigten homogen verteilte TcdA1-Einzelmoleküle, die eine Ähnlichkeit zu YenA1/A2-Pentameren (Abb. 13a) aus *Yersinia entomophaga* aufweisen (Landsberg et al., 2011). Während der Optimierung der Pufferbedingungen fanden wir, d.h. Dr. Christos Gatsogiannis und ich heraus, dass eine weitere Konformation von TcdA1-Einzelmolekülen gereinigt bei pH 4 bzw. pH 11 nachweisbar war (Gatsogiannis et al., 2013). Es ist wichtig zu erwähnen, dass TcdA1 unter diesen Bedingungen als Präpore vorliegt, d.h. nicht in dem membraninsertierten Zustand.

#### 5.1.1 Kristallisation und Strukturbestimmung von TcdA1

Obwohl in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine homogene Verteilung von den bei pH 8 gereinigten TcdA1-Pentameren sichtbar war, bildeten sich reproduzierbare dreidimensionale Kristalle (B-Kristalle) in einer Kristallisationsbedingung aus (Anhang, Abb. 47b). Zusätzlich führte bei pH 5 gereinigtes TcdA1, das eine homogene Verteilung bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte (Abb. 17b), zu Kristallwachstum in derselben (C-Kristalle) und einer zusätzlichen (A-Kristalle) Kristallisationsbedingung (Anhang, Abb. 47a und 47c). Die Kristalle aller Bedingungen wiesen unterschiedliche Kristallformen auf, aber diffraktierten bis circa 10 Å an einer hausinternen Röntgenquelle und zeigten ein Diffraktionsmuster mit nicht voneinander getrennten Röntgenreflexen.



**Abb. 17: Reinigung und elektronenmikroskopische Analyse von TcdA1**

TcdA1 eluiert bei pH 5 in oligomerer Form während einer (a) Größenausschlusschromatographie (Superose 6 10/300 GL) in einem monodispersen Kurvenverlauf bei einem Retentionsvolumen von 12,5 mL (schwarzer Pfeil), das einem Molekulargewicht von 1,15 MDa entspricht. TcdA1 zeigt auf (b) negativkontrastierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen oligomere und homogen verteilte Proteinmoleküle. Die Maßstabskala beträgt 100 nm.

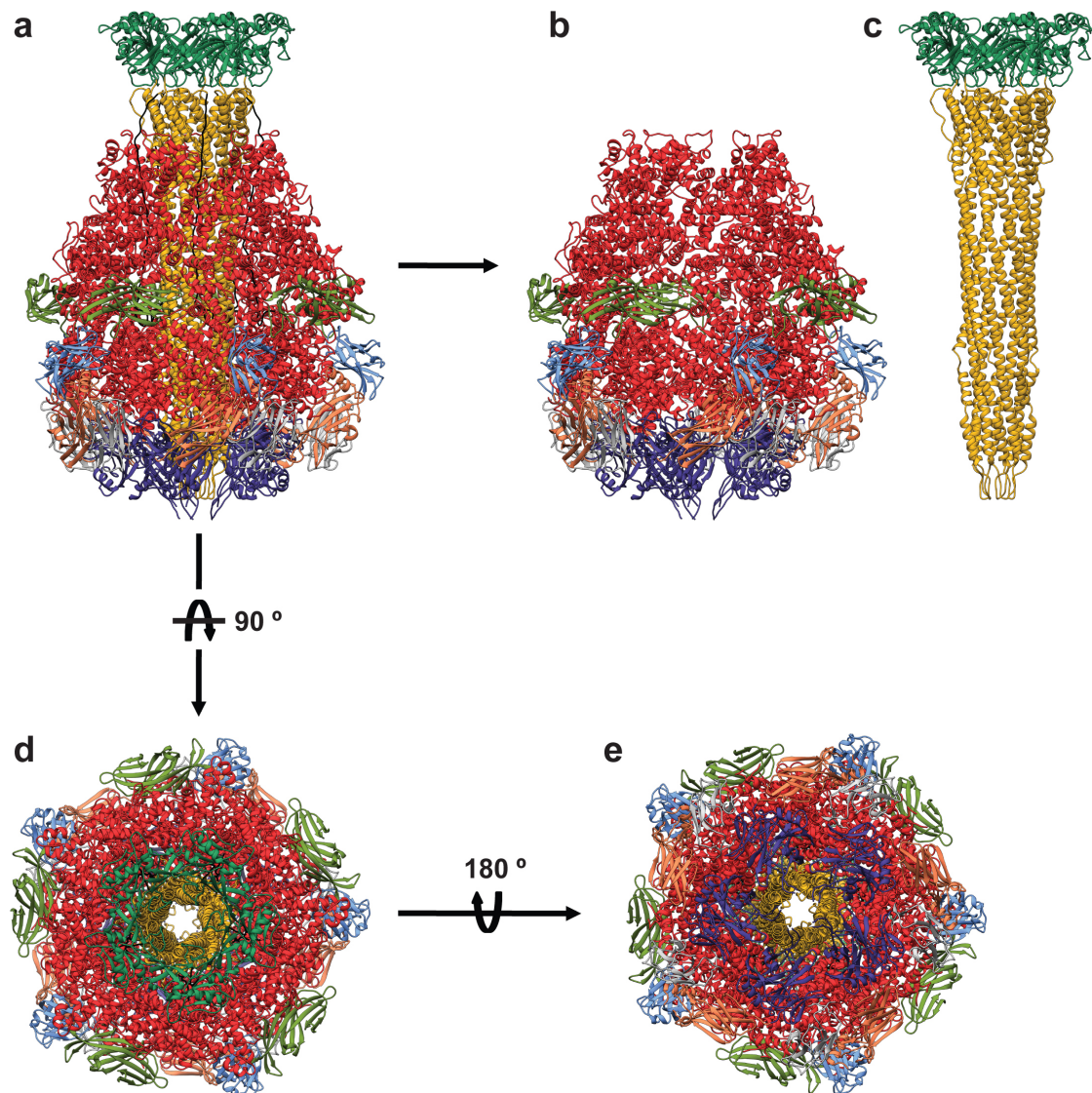
Aus Diffraktionsexperimenten mittels Synchrotronstrahlung am Teilchenbeschleuniger (SLS, Villingen, Schweiz) konnten für A-Kristalle bei einer Auflösung von 4 Å eine Einheitszelle mit den Ausmaßen 303 Å, 321 Å und 668 Å in einem Kristallgitter der einfach orthorhombischen Raumgruppe  $P2_12_12_1$  berechnet werden. Für B- bzw. C-Kristalle wurden bei einer Auflösung von 7 Å eine Einheitszelle mit den Ausmaßen 307 Å, 307 Å und 751 Å bzw. 296 Å, 632 Å und 318 Å

in einem Kristallgitter der basiszentriert orthorhombischen  $C222_1$  bzw. der einfach tetragonalen Raumgruppe  $P4_22_12$  ermittelt (Anhang, Tab. 8). Die Diffraktionsmuster wiesen für alle Kristalle saubere voneinander getrennte Röntgenreflexe bei einer Detektorentfernung von 740 mm bzw. 775 mm auf (Anhang, Abb. 48). Die weiten Detektorentfernungen können an einer hausinternen Röntgenquelle nicht eingestellt werden und erklären die nicht voneinander getrennten Röntgenreflexe in den Vorversuchen. Desweiteren besitzen die Kristallgitter jeweils eine sehr lange Koordinatenachse, die nur bei einer weiten Detektorentfernung aufgelöst werden kann.

Um anhand der Röntgenbeugungsdaten ein atomares Modell von TcdA1 zu erstellen, mussten zunächst die kristallographischen Phasen für die Lösung der Kristallstruktur ermittelt werden. Hierfür kann entweder ein Homologiemodell oder ein schwermetallderivatisierter Datensatz verwendet werden. Die A-Kristalle von TcdA1 diffraktierten bei allen getesteten Schwermetallderivaten zu schlecht, um ein signifikantes anomales Signal für das jeweilige Schwermetall zu erzielen. Ein Homologiemodell von TcdA1 existiert ebenfalls nicht. Aber es gibt eine kryoelektronenmikroskopische Struktur der TcdA1-Präpore, die bei einer Auflösung von 6,3 Å von Dr. Christos Gatsogiannis mittels Einzelmolekülanalyse bestimmt wurde (Gatsogiannis et al., 2013). Dr. Christos Gatsogiannis verwendete die TcdA1-Kryo-EM-Elektronendichte, um ein Polyalaninmodell mit Hilfe des Programms *find\_helices\_strands* in PHENIX zu erstellen (Adams et al., 2010) und stellte es mir zur Verfügung. Dieses Polyalaninmodell enthält  $\alpha$ -Helices sowohl für die  $\alpha$ -helikale porenbildende Domäne als auch für die äußere  $\alpha$ -helikale Domäne.

Das TcdA1-Polyalaninmodell wurde verwendet, um die kristallographischen Phasen mit dem Programm PHASER über die Methode des molekularen Ersatzes zu bestimmen. Eine anschließende Dichtemodifikation über DM und DMMULTI resultierte in ersten definierten röntgenkristallographischen Elektronendichten, die zur Modellierung der TcdA1-Präpore geeignet waren. Eine Einheitszelle der A-Kristalle enthält zwei TcdA1-Pentamere pro asymmetrischer Einheit (Anhang, Abb. 49a), wohingegen B- und C-Kristalle nur ein TcdA1-Pentamer in der asymmetrischen Einheit aufweisen (Anhang, Abb. 49b und c). Die Pentamere in den drei Kristallgittern bilden jeweils gleiche Kristallkontakte über eine Kopf-Kopf-Anordnung mit deren Symmetrieverwandten aus. Jedoch unterscheiden sich die seitlich anliegenden Kristallkontakte der Pentamere von deren Symmetrieverwandten in den drei Kristallgittern (Anhang, Abb. 49a und c). Das unterschiedliche Diffraktionsverhalten der A-, B- und C-Kristalle

kann aber nicht auf diese geringen Unterschiede der Kristallkontakte zurückgeführt werden, da sie die Kristallpackung nicht signifikant ändern.



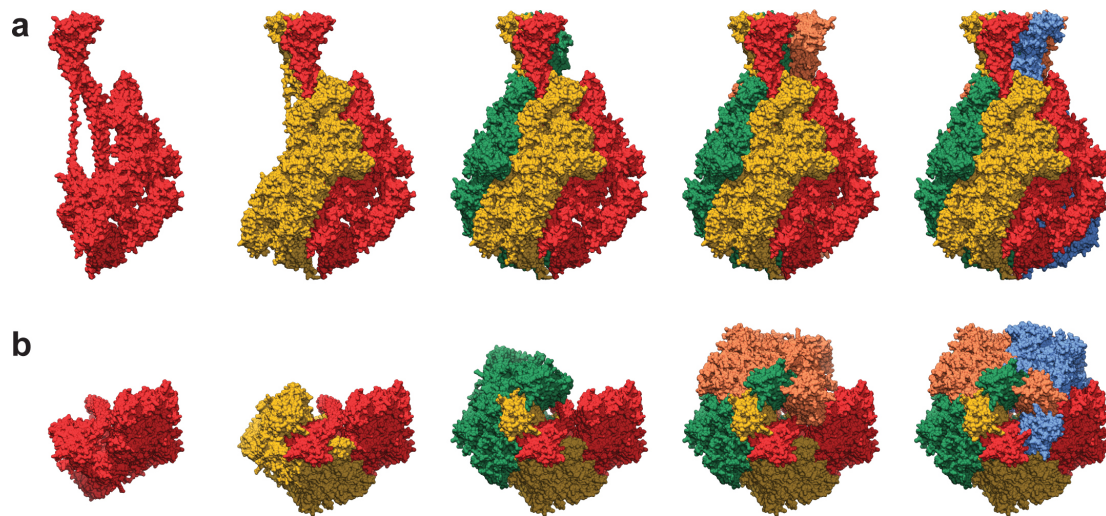
**Abb. 18: Atomare Struktur des TcdA1-Pentamers**

Fünf Protomere bilden ein stabiles TcdA1-Pentamer. Atomare Struktur eines TcdA1-Pentamers (**a-c**) in Seitenansicht, (**d**) in Draufsicht und (**e**) in Untersicht. Darstellung der (**b**) äußeren Hülle und (**c**) des zentralen Translokationskanals eines TcdA1-Pentamers. Die Domänen des TcdA1-Pentamers sind in den zugehörigen Farben (siehe Abb. 20b) dargestellt.

Ein komplettes Modell des A-Kristalldatensatzes der TcdA1-Präpore (Abb. 18) wurde von Dr. Rouslan Efremov gebaut und im weiteren Verlauf von mir verfeinert und verifiziert. Das finale verfeinerte Modell besteht aus 24898 Aminosäuren mit zwei TcdA1-Pentameren in der asymmetrischen Einheit bei einer Auflösung von 4 Å bzw. 3,7 Å, 4,2 Å und 3,5 Å nach Anisotropie-Korrektur ( $R_{\text{work}} = 0,2426$ ,  $R_{\text{free}} = 0,2950$ ). Ein Vergleich der experimentellen und



verfeinerten Elektronendichtekarte (Anhang, Abb. 50) zeigt eindeutig eine Verbesserung der Elektronendichte, die das Erstellen eines akkurateren Modells der TcdA1-Präpore erlaubte.



**Abb. 19: Anordnung der einzelnen TcdA1-Protomere im TcdA1-Pentamer**

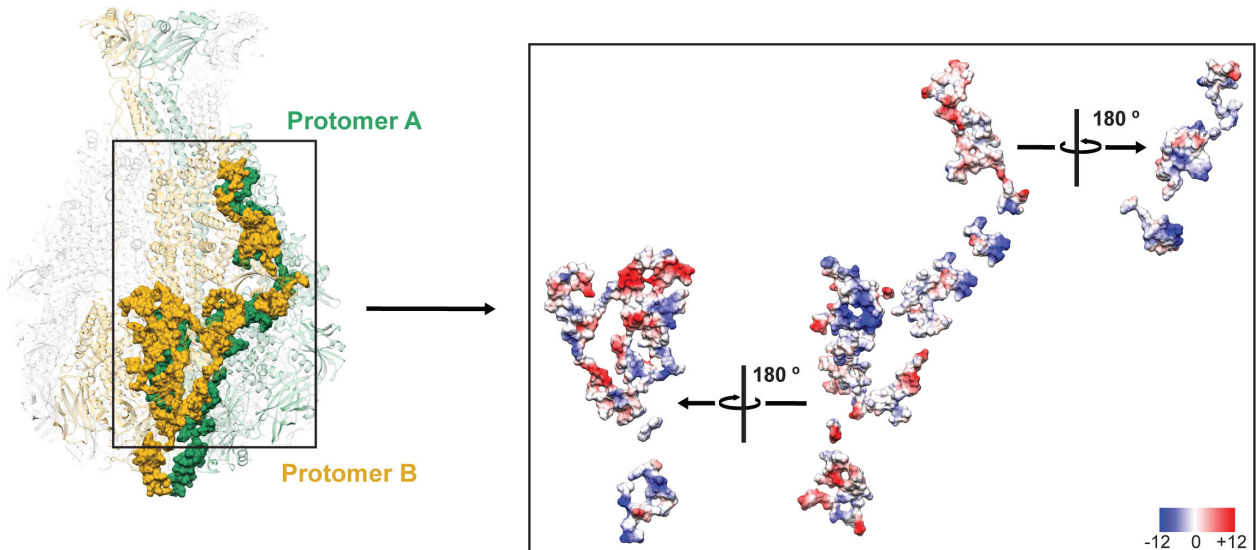
Oberflächendarstellung des TcdA1-Protomers A sowie der TcdA1-Protomere AB, ABC, ABCD und ABCDE in (a) Seitenansicht bzw. (b) Draufsicht abgebildet. Die TcdA1-Protomere A bis E sind in den Farben rot, gelb, grün, orange und blau eingefärbt.

Die einzelnen Protomere der TcdA1-Präpore sind mit den nächsten Nachbarprotomeren verwunden und bilden eine stabile pentamere Struktur (Abb. 18 und 19). Das gesamte Pentamer lässt sich in zwei große Bereiche einteilen. Es besteht aus einem zentralen Kanal (Abb. 18c) und aus einer äußeren Hülle (Abb. 18b), die über einen gestreckten 44 Aminosäure langen Bereich (Verknüpfungs-Domäne) miteinander verbunden sind (Abb. 21a). Eine Analyse der B-Faktorverteilung eines TcdA1-Protomers (Anhang, Abb. 51) zeigt niedrige B-Faktoren im Bereich des zentralen Kanals und höhere B-Faktoren im Bereich der äußeren Hülle. Dies lässt vermuten, dass der zentrale Kanal der TcdA1-Präpore statisch bzw. rigid und die äußere Hülle eher etwas flexibel ist, zumindest im Kristall.

### **5.1.2 Die TcdA1-Protomere werden über komplementäre Ladungsinteraktionsflächen zusammengehalten**

Eine stabile Konformation der TcdA1-Präpore wird durch eine Ineinanderwindung der einzelnen Protomere ermöglicht (Abb. 19). Wie in 5.1.1 beschrieben und von Gatsogiannis et al. gezeigt nimmt TcdA1 bei pH 5 bis 8 eine stabile Präporen-Konformation und bei pH 4 bzw. pH 11 eine stabile Poren-Konformation ein (Gatsogiannis et al., 2013). Diese Konformationsänderung

findet hauptsächlich in der äußeren Hüllendomäne von TcdA1 statt und wird durch eine mögliche Flexibilität aufgrund erhöhter B-Faktoren in diesem Bereich bekräftigt (Anhang, Abb. 51). Auf die Interaktion der einzelnen Protomere im zentralen Kanalbereich wird in 5.1.6 genauer eingegangen.



**Abb. 20: Interaktionsfläche und Ladungsverteilung zweier Protomere in einem TcdA1-Präporen-Pentamer**

Gesamtdarstellung (links) der Interaktionsfläche von Protomer A (grün) und Protomer B (gelb) in einem TcdA1-Präporen-Pentamer. Der Ausschnitt (rechts) zeigt die komplementäre Ladungsverteilung des elektrostatischen Coloumbpotentials bei pH 7 (in -12 bis +12 kcal/mol).

Eine pH-abhängige Konformationsänderung in TcdA1 lässt vermuten, dass bei der Interaktion zwischen den Protomeren in der TcdA1-Präpore Kräfte wirken müssen, die die Präpore in einem bestimmten pH-Bereich stabilisieren. Eine Analyse der Interaktionsfläche benachbarter Protomere der TcdA1-Präpore zeigt, dass Protomer A und B über den kompletten Bereich der äußeren Hülle miteinander interagieren (Abb. 20, linkes Bild). Ferner führt eine elektrostatische Coloumb-Analyse der Interaktionsfläche bei pH 7 zu einer eindeutigen komplementären Ladungsverteilung in Protomer A und B (Abb. 20, rechtes Bild). Ladungskomplementarität und die Form der Oberfläche eines Proteins sind die Hauptmerkmale für eine spezifische Ladungsverteilung (Sulea und Purisima, 2003). Die Ladungselektivität wird ausschließlich durch die Oberflächenformgebung eines Proteins bestimmt und zeigt die höchste Selektivität an direkten Interaktionsflächen zwischen Proteinen. Dies trifft auf die Interaktion der einzelnen Protomere der TcdA1-Präpore zu.

5.1.3 Ein TcdA1-Protomer besteht aus acht Domänen

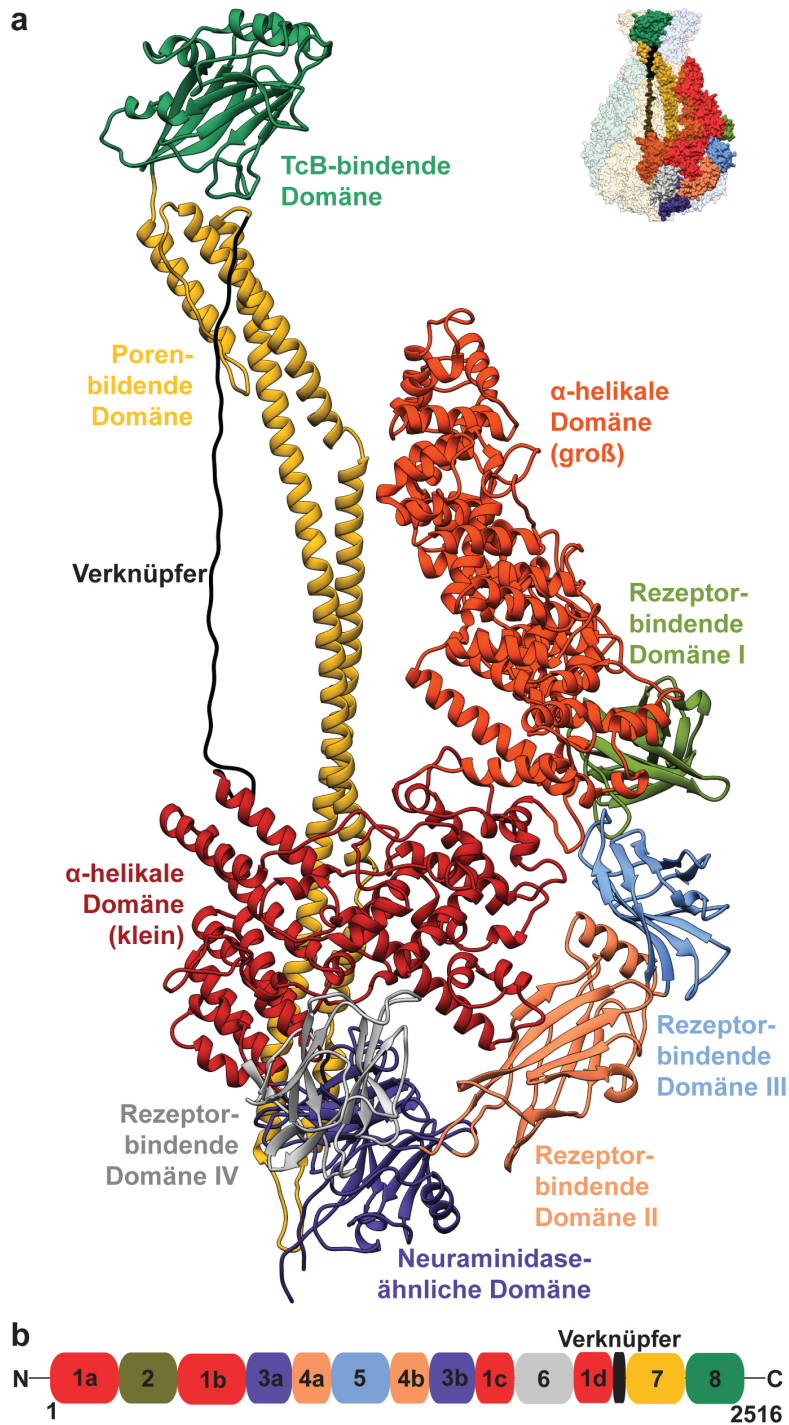


Abb. 21: Atomare Struktur eines TcdA1-Präporen-Protomers

Im rechten obigen Bildrand ist ein Überblick der Lage eines TcdA1-Protomers in einem Pentamer schematisch dargestellt. (a) Kristallstruktur und (b) Domänenanordnung eines TcdA1-Präporen-Protomers. Ein TcdA1-Protomer besteht aus acht Domänen, welche von N- zu C-Terminus nachfolgend benannt und eingefärbt sind: große  $\alpha$ -helikale Domäne (hellrot), Rezeptor-bindende Domäne 1 (olivgrün), kleine  $\alpha$ -helikale Domäne (dunkelrot), Neuraminidase-ähnliche Domäne (violett), Rezeptor-bindende Domäne 2 (koralle), Rezeptor-bindende Domäne 3 (blau), Rezeptor-bindende Domäne 4 (grau), Verknüpfers (schwarz), Poren-bildende Domäne (gelb) und TcB-bindende Domäne (grün).

Nach einer strukturbioologischen Analyse durch bioinformatische 3D-Modellvergleiche wurde ein TcdA1-Protomer in acht Domänen unterteilt (Abb. 21a und b). Die größte Domäne (AS 1-297, 434-1090, 1608-1632, 1762-1972) beginnt am N-Terminus eines TcdA1-Protomers und besteht ausschließlich aus  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturelementen. Diese  $\alpha$ -helikale Domäne ist aus einer großen (hellrot) und einer kleinen (dunkelrot) Untereinheit aufgebaut. Auf die  $\alpha$ -helikale Domäne folgen die rezeptorbindende Domäne I (AS 298-433; olivgrün), die neuraminidaseähnliche Domäne (AS 1091-1307,1581-1607; dunkelblau) sowie die rezeptorbindende Domäne II (AS 1308-1382,1491-1580; orange), die rezeptorbindende Domäne III (AS 1383-1490; hellblau) und die rezeptorbindende Domäne IV (AS 1633-1761; hellgrau). Die ersten fünf Domänen eines Protomers bilden zusammen mit den äquivalenten Domänen der anderen Protomere die äußere Hülle der TcdA1-Präpore.

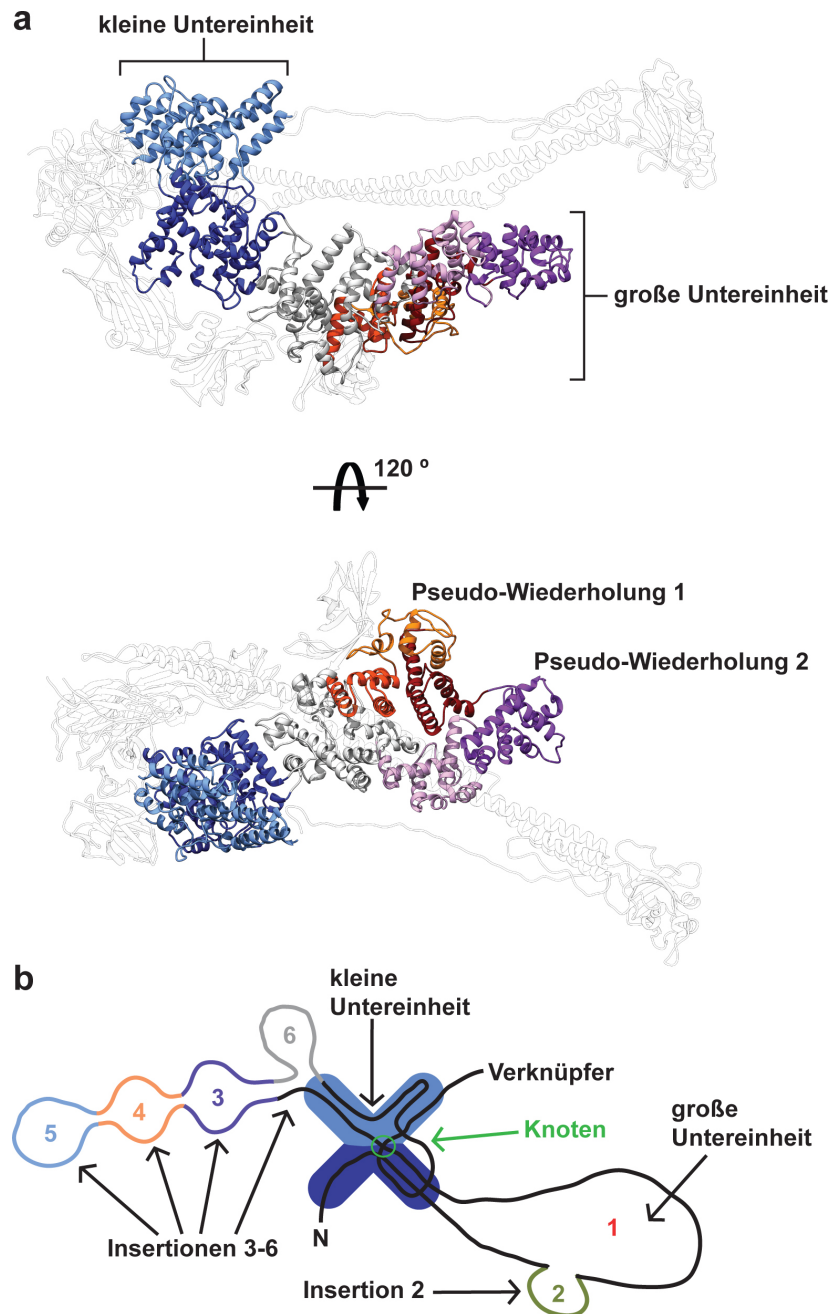
Auf die ersten fünf Domänen eines Protomers folgen drei Domänen, die den zentralen Kanal (Abb. 18c) mit den äquivalenten Domänen der restlichen vier Protomere bilden. Die Protomere des Kanals bestehen jeweils aus der Verknüpf-Domäne (AS 1973-2015; schwarz), der porenbildenden Domäne (AS 2016-2327; gelb) und der TcB-bindenden Domäne (AS 2328-2516; grün), die den C-Terminus eines Protomers faltet und somit die Struktur abschließt.

#### **5.1.4 Die $\alpha$ -helikale Domäne der äußeren Hülle eines TcdA1-Protomers zeigt eine unbekannte Struktur mit neuer Domänenanordnung**

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben bilden die ersten fünf Domänen die äußere Hülle eines Protomers in der TcdA1-Präpore. Hierbei zeigt die  $\alpha$ -helikale Domäne keine Homologie zu bekannten Modellen in den strukturbioologischen Datenbanken. Die restlichen fünf Domänen der äußeren Hülle sind aus  $\beta$ -Faltblatt-Sekundärstrukturelementen aufgebaut, die strukturell homolog zu eukaryontischen Rezeptor-Untereinheiten sowie zu Neuraminidasen sind (siehe Abschnitt 5.1.5).

Die kleine und große Unterheit der  $\alpha$ -helikalen Domäne (Abb. 22a) stehen in einem rechten Winkel zueinander und bilden eine L-förmige Struktur aus. Ferner nimmt die kleine Untereinheit eine X-förmige Struktur mit einer Pseudozweifachsymmetrie ein (hell- und dunkelblau), wohingegen die große Untereinheit zwei unterschiedliche Pseudowiederholungen enthält (rot-orange bzw. violett-flieder), die ihrerseits aus verschiedenen *helix-loop-helix* (HLH)-Motiven

aufgebaut sind (Abb. 22a). Sowohl die kleine als auch die große Untereinheit interagieren mit den Untereinheiten der Nachbarprotomere (Abb. 18b und 19) und haben in der Röntgenstruktur niedrige B-Faktoren (Anhang, Abb. 51).



**Abb. 22: Struktur der äußeren Hülle sowie Domänenanordnung in einem TcdA1-Präporen-Protomer**

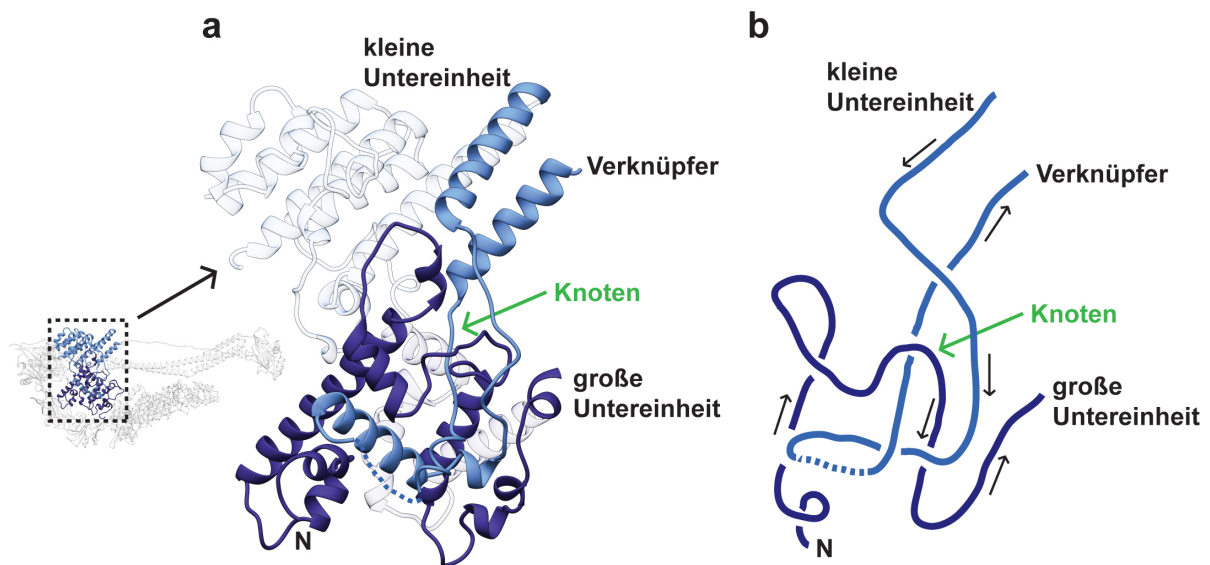
Die äußere Hülle eines TcdA1-Präporen-Protomers besteht aus (a) einer kleinen Untereinheit, die eine strukturelle Pseudo-2fach-Symmetrie (hell- und dunkelblau) aufweist, sowie aus einer großen Unterheit, welche in weitere Unterheiten mit Pseudo-Wiederholungen 1 und 2 (1=rot und orange, 2=violett und lila) unterteilt werden kann. Beide Unterheiten stehen in einem rechten Winkel senkrecht aufeinander und enthalten (b) strukturelle Insertionen der Domänen 2 bis 6 sowie einen molekularen Knoten (grün).

In der Anordnung der einzelnen Domänen eines TcdA1-Protomers (Abb. 21b) ist zu erkennen, dass die  $\alpha$ -helikale Domäne der äußeren Hülle aus vier Teildomänen 1a bis 1d besteht, die von den rezeptorbindenden Domänen 1 bis 4 unterbrochen werden. Eine schematische Darstellung der äußeren Hülle beschreibt diese Domänen als strukturelle Insertionen der  $\alpha$ -helikalen Domäne (Abb. 22b). Hierbei bilden die rezeptorbindenden Domänen I bis IV eine kleine bzw. große Insertion, bei denen jeweils N- und C-Terminus weniger als 7 Å voneinander entfernt sind. Dies lässt vermuten, dass diese Domänen aufgrund eines evolutionären Selektionsdrucks in eine möglicherweise einfachere äußere Hülle insertiert wurden. Dies wird durch Sequenzvergleiche von TcdA1 aus *P. luminescens* mit homologen A-Komponenten aus insekten-, pflanzen- und humanpathogenen Prokaryonten bestätigt, bei denen die rezeptorbindenden Domänen 1 bis 4 in einigen A-Komponenten wie zum Beispiel bei *Yersinia entomophaga* (Anhang, Tab. 9) oder *Yersinia pestis* (Anhang, Tab. 10) fehlen. Zusätzlich verdeutlicht eine Darstellung des Konservierungsgrades der TcdA1-Struktur, dass die rezeptorbindenden Domänen 1 bis 4 keine Konservierung aufweisen, wodurch die Möglichkeit einer evolutionär gerichteten Insertion oder auch Deletion gestärkt wird (Anhang, Abb. 52).

Typische Insertionen oder Deletionen von Domänen treten normalerweise am N- oder C-Terminus von Proteinen auf (Weiner et al., 2006). Die rezeptorbindenden Domänen I bis IV und die neuraminidaseähnliche Domäne des TcdA1-Protomers hingegen insertieren in der Mitte der  $\alpha$ -helikalen Domänen (Abb. 22b). Diese Art von Insertionen ist nur bei Domänenwiederholungen von *tandem repeats* bekannt, die wahrscheinlich durch interne Genduplikationen entstanden sind (Bjorklund et al., 2006). Der genaue Mechanismus der Domänenduplikationen ist nicht bekannt, jedoch scheint die Größe der zu duplizierenden Domänen nicht relevant zu sein. Die möglichen Funktionen der insertierten bzw. deletierten rezeptorbindenden Domänen 1 bis 4 und der neuraminidaseähnlichen Domäne eines TcdA1-Protomers werden im nächsten Abschnitt im Detail diskutiert.

Eine weitere strukturelle Besonderheit der kleinen Unterheit der  $\alpha$ -helikalen Domäne ist ein molekularer Proteinknoten (Abb. 23a). Dieser Knoten bildet sich zwischen der Region AS 100-130 (Abb. 23a, dunkelblau) und der Region AS 1900-1950 (Abb. 23a, hellblau) der kleinen Untereinheit aus und zeigt nach Rolfsen et al. einen Kleeblatt-förmigen  $3_1$  Knoten (Rolfsen, 1976). Diese Knotenart stellt die einfachste Form eines Knotens dar, jedoch bildet sich der Knoten in einem TcdA1-Protomer erst nach 1800 Aminosäuren aus. Zwischen Knotenanfang

und Knotenende insertieren alle Domänen der äußeren Hülle, das heißt rezeptorbindende Domäne I bis IV sowie die neuraminidaseähnliche Domäne eines TcdA1-Protomers (Abb. 23b).



**Abb. 23: Atomare Struktur und schematischer Aufbau des molekularen Proteinknotens in der kleinen Untereinheit der  $\alpha$ -helikalen Domäne von TcdA1**

Eine Besonderheit in der (a) Struktur der kleinen Untereinheit der  $\alpha$ -helikalen Domäne von TcdA1 ist ein molekularer Knoten (grün), durch den die Struktur eine bestimmte Faltung einnimmt. (b) Der schematische Aufbau zeigt die beiden pseudosymmetrischen Domänen (hell- und dunkelblau) sowie die Verlaufsrichtung (in Pfeilen angedeutet) der Polypeptidkette in der kleinen Untereinheit. Die gestrichelte Linie (hellblau) in der Struktur und des Schemas stellt sieben fehlende ungeordnete Aminosäuren in der TcdA1-Kristallstruktur dar.

Dies lässt vermuten, dass sich die äußere Hülle evolutionär unabhängig vom zentralen Kanal der TcdA1-Präpore entwickelt haben könnte.

Die Funktion von Proteinknoten wird kontrovers in der Literatur diskutiert. Zum einen können Proteinknoten die Faltung eines Proteins in eine bestimmte Konformation ermöglichen und zum anderen können sie gefaltete Proteine in einer bestimmten Konformation stabilisieren (Muller et al., 2002; King et al., 2007). Der Proteinknoten in der äußeren Hülle der TcdA1-Präpore könnte die pseudozweifach-symmetrische Faltung der kleinen Unterheit ermöglichen und dadurch die äußere Hülle stabilisieren. Zusätzlich würde diese Stabilisierung zu einer rigiden kleinen Untereinheit führen, die die äußere Hülle während einer Konformationsänderung von TcdA1-Präpore zu TcdA1-Pore zusammenhalten könnte.

### 5.1.5 TcdA1 besitzt in der äußeren Hülle eine neuraminidaseähnliche und vier rezeptorbindende Domänen

Die rezeptorbindenden Domänen I bis IV und die neuraminidaseähnliche Domäne der äußeren Hülle der TcdA1-Präpore sind fast ausschließlich aus  $\beta$ -Faltblatt-Sekundärstrukturelementen aufgebaut (Abb. 21a). Die neuraminidaseähnliche Domäne sitzt am untersten Ende der Protomerstruktur (Abb. 21a), interagiert direkt mit den orthologen Domänen der anderen Protomere und bildet somit ein intramolekulares Homopentamer in der TcdA1-Präpore aus. Obwohl das Genom von *Photobacterium*, *Xenorhabdus* oder *Yersinia* Gattungen keine Gene enthält, die basierend auf Sequenzhomologien sialidaseähnliche Proteine kodieren, ist die Domäne strukturell homolog zu Neuraminidasen (Abb. 24, zweite Zeile). Neuraminidasen gehören zur Gruppe der Sialidasen und beschreiben Hydrolasen, die Sialinsäuren von Sialoglykoproteinen an Wirtszellen spalten (Varghese et al., 1983). Sialoglykoproteine findet man vorwiegend in den mukosahaltigen Geweben von Säugetieren wie zum Beispiel in den Atmungsorganen oder dem Gastrointestinaltrakt (Lewis und Lewis, 2012). Bakterielle Sialidasen werden auch als Virulenzfaktoren von pathogenen Prokaryonten sekretiert, da Letztere die von Sialidasen hydrolysierten Sialinsäuren als Nahrungsquelle oder die hydrolysierten Glykoproteine (Zytokinrezeptoren) zur Anheftung für eine mögliche Zellinvasion nutzen (Moustafa et al., 2004). Diese Funktionen lassen vermuten, dass die neuraminidaseähnliche Domäne die Sialinschicht von Glykoproteinen hydrolysieren könnte, um die TcdA1-Präpore in die Nähe der Wirtszellmembran zu bringen. Von dort könnte TcdA1 in den Porenzustand übergehen, die Wirtszellmembran durchstoßen und die ADP-Ribosyltransferase C3 in die Wirtszelle übertragen.

Die rezeptorbindenden Domänen I bis IV (Abb. 21b) der äußeren Hülle eines TcdA1-Protomers zeigen strukturelle Homologien zu einer Vielzahl an Rezeptoruntereinheiten (Abb. 24) und werden daher rezeptorbindende Domäne I bis IV genannt (Abb. 21a). Homologe Rezeptorunterheiten treten in der Gruppe der Interleukin (IL)- und Interferon (IFN)-Rezeptoren auf (z. B. IL2-, IL-5-, IL-12-, IL17- oder IFN $\gamma$ -Rezeptoren). Zusätzlich ist die rezeptorbindende Domäne 1 homolog zu *Myeloid differentiation factor 2* (MD-2, Abb. 24 erste Zeile), einem Interaktionspartner von *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs).

MD-2 ist ein direkter Interaktionspartner von *Toll-like*-Rezeptoren, die zusammen einen heterodimeren Komplex formen (Kim et al., 2007). Während einer Infektion setzen Bakterien



Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS) frei, die von *pattern recognition receptors* (PRR) wie TLR4 erkannt werden (Beutler und Rietschel, 2003). Genauergesagt bindet LPS in die hydrophobe Tasche der  $\beta$ -sandwich Struktur von MD-2 und induziert dadurch eine

Domänenaufbau	Domänenstruktur	Struktur-Homologe (pdb ID, RMSD)	
		MD-2 (2E56, 3.8)	IL17-R $\alpha$ (4HSA, 2.6)
		Sialidase (2F11, 4.3)	Furanosidase (3QEF, 3.7)
		IFN $\gamma$ -R $\alpha$ (4EQ2, 3.3)	IL17-R $\alpha$ (4HSA, 3.3)
		IL2-R $\alpha$ (3QAZ, 2.8)	IL15-R $\alpha$ (4GS7, 3.1)
		IFN $\gamma$ -R $\alpha$ (3BES, 3.0)	IL12-R $\beta$ (3QWR, 2.8)
		Furin P-Domäne (1P8J, 2.7)	Kexin P-Domäne (1R64, 3.0)

**Abb. 24: Topologie und Homologie einzelner TcdA1-Domänen**

Darstellung der Domärentopologie (erste Spalte) sowie der Domänenstruktur (zweite Spalte) der Rezeptor-bindenden Domäne I (olivgrün), der Neuraminidase-ähnlichen Domäne (violett), der Rezeptor-bindenden Domäne II (koralle), der Rezeptor-bindenden Domäne III (blau), der Rezeptor-bindenden Domäne IV (grau) sowie der TcB-bindenden Domäne (grün). Jeweils zwei Strukturhomologe sowie deren pdb-Identifikationsnummern (pdb ID) und mittlere quadratische Standardabweichungen (RMSD) werden in dritter und vierter Spalte dargestellt.

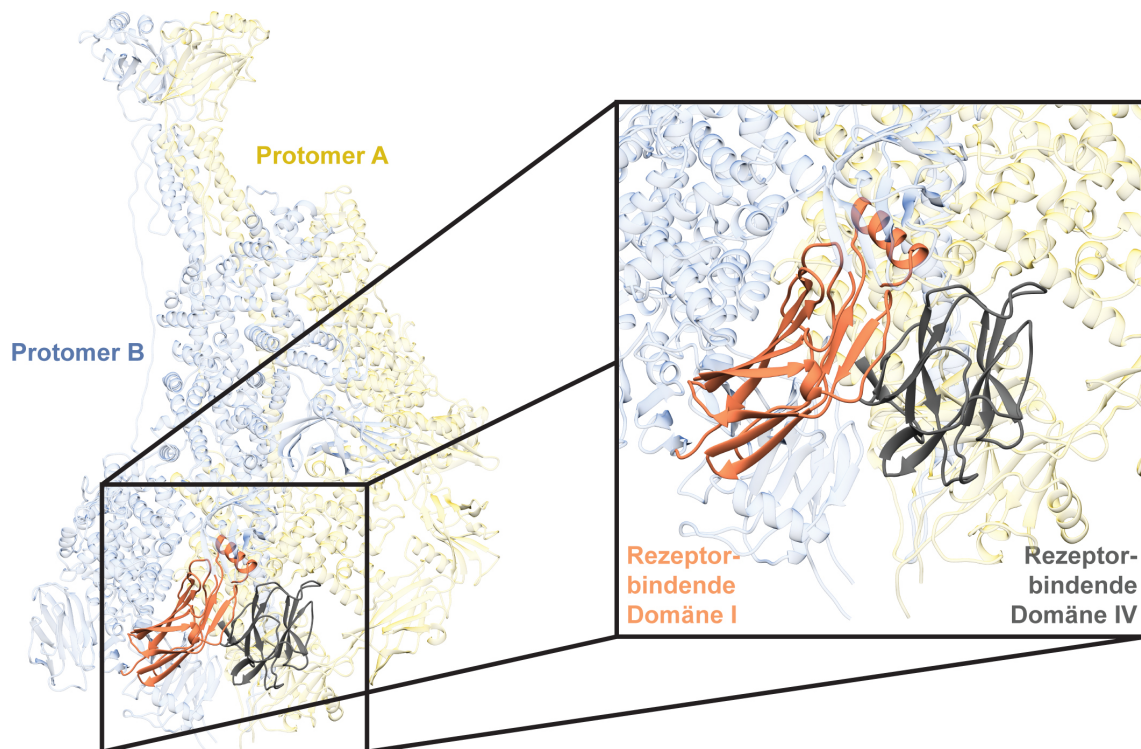
Dimerisierung zweier TLR4/MD-2/LPS Komplexe, die die Signale für die sofortige Aktivierung der humoralen Immunabwehr in die Zelle weiterleiten (Ohto et al., 2007; Park et al., 2009).

Die rezeptorbindende Domäne I eines TcdA1-Protomers zeigt in ihrem Domänenaufbau (Abb. 24 erste Zeile, erste Reihe), wie auch MD-2, neun antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, die eine  $\beta$ -sandwich Struktur ausbilden. Der Innenraum der rezeptorbindenden Domäne I zeigt ausschließlich hydrophobe Aminosäuren und könnte daher auch hydrophobe Moleküle wie LPS binden. Da MD-2 nicht nur LPS, sondern auch Lipopolysaccharid-Derivate bindet, die auch von Bakterien produziert werden (Park und Lee, 2013), könnte die rezeptorbindende Domäne I LPS-ähnliche Moleküle komplexieren und abfangen, um die humorale Immunabwehr zu supprimieren. Das Vorhandensein von fünf der rezeptorbindenden Domäne I in einer TcdA1-Präpore würde die Komplexierung erhöhen und könnte eine Immunsuppression verstärken. Die rezeptorbindende Domäne II bis IV weisen auch einen hydrophoben Innenraum auf, in dem sie von *P. luminescens* sezernierte Endotoxine wie LPS binden und dadurch die Immunsuppression zusätzlich verstärken könnten. Jedoch zeigen sie eine von rezeptorbindender Domäne I unterschiedliche Domänenstruktur.

Die rezeptorbindenden Domänen II bis IV eines TcdA1-Pentamers bestehen jeweils aus acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die eine typische  $\beta$ -sandwich Struktur aufbauen (Abb. 24, Zeile 3-5, Reihe 1) und aufgrund der  $\beta$ -Faltblattanordnung eine hohe strukturelle Homologie zu Rezeptoruntereinheiten der Immunglobulin (Ig)-Rezeptor-Superfamilie aufweisen (Abb. 24, Zeile 3-5, Reihe 3-4).

IL- und IFN-Rezeptoren gehören zu dieser Superfamilie und oligomerisieren in heterotetramere Ligand-Rezeptorkomplexe, die sich aus einem Liganden (IL bzw. IFN) und drei Rezeptorunterheiten ( $\alpha$ -, $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette) zusammensetzen (Wang et al., 2005; Thomas et al., 2011). Zum Beispiel wird IL-2 sowohl als heterotrimerer IL2-IL2-R $\beta\gamma$ -Komplex auf natürlichen Killer (NK) Zellen, Makrophagen und ruhenden T-Zellen exprimiert und tritt als kompletter heterotetramerer IL2-IL2-R $\alpha\beta\gamma$ -Komplex nur auf aktivierten T-Zellen auf (Takeshita et al., 1992; Nelson und Willerford, 1998). Die Komplexbildung unterscheidet zusätzlich eine ansteigende Rezeptor-Ligand-Affinität von 10 nM bei einem heterotrimeren zu 10 pM bei einem heterotetrameren Komplex, wodurch eine kooperative Bindung der Komplexe beschrieben wird und die Effizienz einer Signalweiterleitung erhöht werden soll (Wang, 1987).

Neben einer potentiellen immunsuppressiven Wirkung der rezeptorbindenden Domänen II bis IV durch Bindung von LPS-Molekülen in ihrer hydrophoben Tasche, könnten die Rezeptoren IL- und IFN-Moleküle komplexieren, um zum einen zusätzlich eine Immunsuppression zu verstärken und zum anderen über IL oder IFN an deren Rezeptoruntereinheiten der Wirtszelle zu binden. Die Rezeptoren würden die TcdA1-Präpore sehr nahe an der Wirtszellmembran stabilisieren und eine Membraninsertion erleichtern. Die rezeptorbindenden Domänen wären in diesem Fall keine rezeptorbindenden Domänen, sondern ebenfalls Rezeptoren.



**Abb. 25: Interaktion von rezeptorbindender Domäne IV in Protomer A mit der rezeptorbindenden Domäne I in Protomer B**

Darstellung der Interaktion von der rezeptorbindenden Domäne IV (grau) in Protomer A (hellgelb) mit der rezeptorbindenden Domäne I (koralle) in Protomer B (hellblau) im gesamten TcdA1-Protomer (links) sowie einem vergrößerten Bereich (rechts).

Die rezeptorbindenden Domänen I bis IV bilden in einem TcdA1-Protomer eine zusammenhängende Interaktionsfläche, die mit mehreren Molekülen von LPS und von IL bzw. IFN interagieren könnte (Abb. 21a). Diese Interaktionsfläche weitet sich auf das Nachbar-Protomer aus, da die rezeptorbindende Domäne IV von Protomer A mit rezeptorbindender Domäne I von Protomer B über Wasserstoffbrücken Kontakte ausbilden könnte (Abb. 25; Anhang, Tab. 11). Ein daraus entstehender „Superrezeptor“ würde sich in einem Ring um die

komplette TcdA1-Präpore erstrecken und die Wahrscheinlichkeit für die Bindung von IL oder IFN an rezeptorbindende Domänen I bis IV erhöhen, damit IL bzw. IFN an deren Rezeptoruntereinheiten der Wirtszelle binden könnten.

Neben TcdA1 aus *P. luminescens* besitzt die *protective antigen* (PA) Domäne des Anthraxtoxins an dessen C-Terminus eine (Ig)-Rezeptor-ähnliche  $\beta$ -sandwich Struktur, mit der es an dessen Rezeptor, dem *capillary morphogenesis protein 2* (CMG2), bindet (Petosa et al., 1997; Scobie und Young, 2005). CMG2 weist eine Homologie zu integrinähnlichen Rezeptoren und nicht zu Zytokinrezeptoren auf, jedoch haben beide Rezeptorarten bei Anthraxtoxin und TcdA1 dieselbe Funktion: sie sind in der Wirtszellmembran verankert und binden somit den Toxinkomplex an die Membran (Lacy et al., 2004).

### **Zusammenfassung: Die äußere Hülle von TcdA1**

Die äußere Hülle von TcdA1 beschreibt eine Multidomänenstruktur, die aus einer  $\alpha$ -helikalen Domäne mit einer unbekanntem Proteinfaltung, aus einer neuraminidaseähnlichen Domäne und aus vier rezeptorbindenden Domänen aufgebaut ist. Die  $\alpha$ -helikale Domäne besteht aus einer großen und kleinen Unterheit, von denen letztere einen kleeblattförmigen  $3_1$  Proteinknoten enthält. Dieser könnte als mögliche Funktion die Stabilisierung der  $\alpha$ -helikalen Domäne von TcdA1 in der Präporenkonformation übernehmen. Die rezeptorbindenden Domänen I bis IV könnten mit LPS und IL bzw. IFN interagieren, wodurch die humorale Immunabwehr supprimiert würde. Zudem könnte die TcdA1-Präpore an Zytokinrezeptorunterheiten der Wirtszelle binden. Diese Bindung würde TcdA1 an der Wirtszellmembran bis zur pH-abhängigen Membraninsertion stabilisieren.,

Die hypothetische Funktion von TcdA1 als Immunsuppressor und zusätzlich als Superrezeptor würde der Umgehung der humoralen Insektenimmunabwehr durch *P. luminescens* einen völlig neuen Denkansatz geben (siehe Abschnitt 2.2.1 und Abb. 2). Die Nachahmung eines Superrezeptors in TcdA1 könnte ein Ansatzpunkt für die Entdeckung von Immunmodulatoren sein, die die Tc-Toxinbindung an die Wirtszellmembran hemmen und damit die Membranpenetration verhindern.

5.1.6 Die zentrale porenbildende Domäne eines Protomers bildet im TcdA1-Pentamer einen 220 Å langen Translokationskanal aus

Die Kristallstruktur der TcdA1-Präpore zeigt neben der äußeren Hülle (Abb. 18b) einen zentralen Translokationskanal (Abb. 18c), der aus fünf porenbildenden Domänen (AS 2016-2327) aufgebaut ist (Abb. 21a). Jede porenbildende Domäne besteht aus zwei 200 Å langen

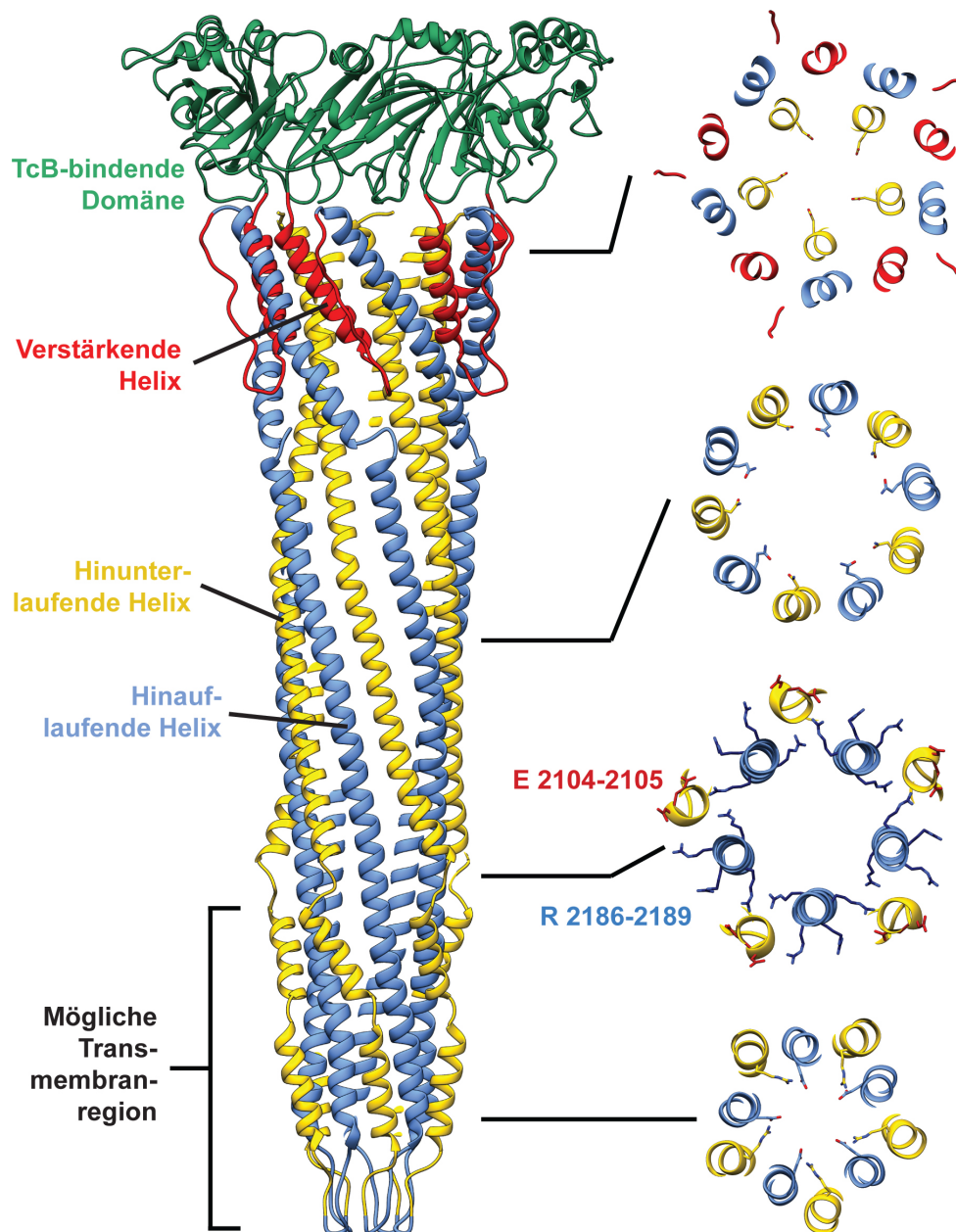


Abb. 26: Aufbau des TcdA1-Translokationskanals

Seitlicher (links) und in Schnitten (rechts) dargestellter Aufbau des TcdA1-Translokationskanals. Jeweils fünf hinunterlaufende (gelb) und hinauflaufende (blau) Helices bilden den zentralen Bereich des Kanals. Das obere Ende des Kanals wird durch fünf verstärkende Helices (rot) und eine abschließende Kopfregion bestimmt, die aus fünf TcB-bindenden Domänen (grün) besteht. Eine mögliche Transmembranregion ist schematisch eingezeichnet, an die am oberen Ende ein Kranz aus geladenen Aminosäuren (Glutamate (E) 2104-2105 und Arginine (R) 2186-2189) anschließt.

teilweise unterbrochenen  $\alpha$ -Helices (Abb. 26, gelb und hellblau), die in der TcdA1-Präpore einen Kanal aus zehn  $\alpha$ -Helices formen.

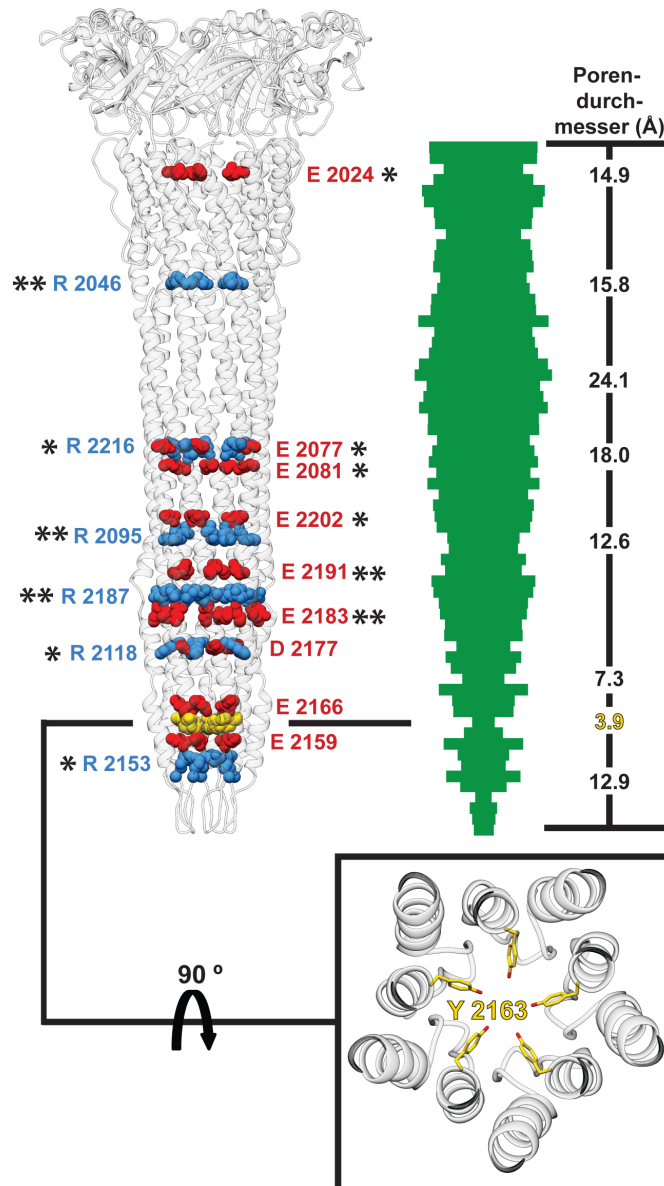
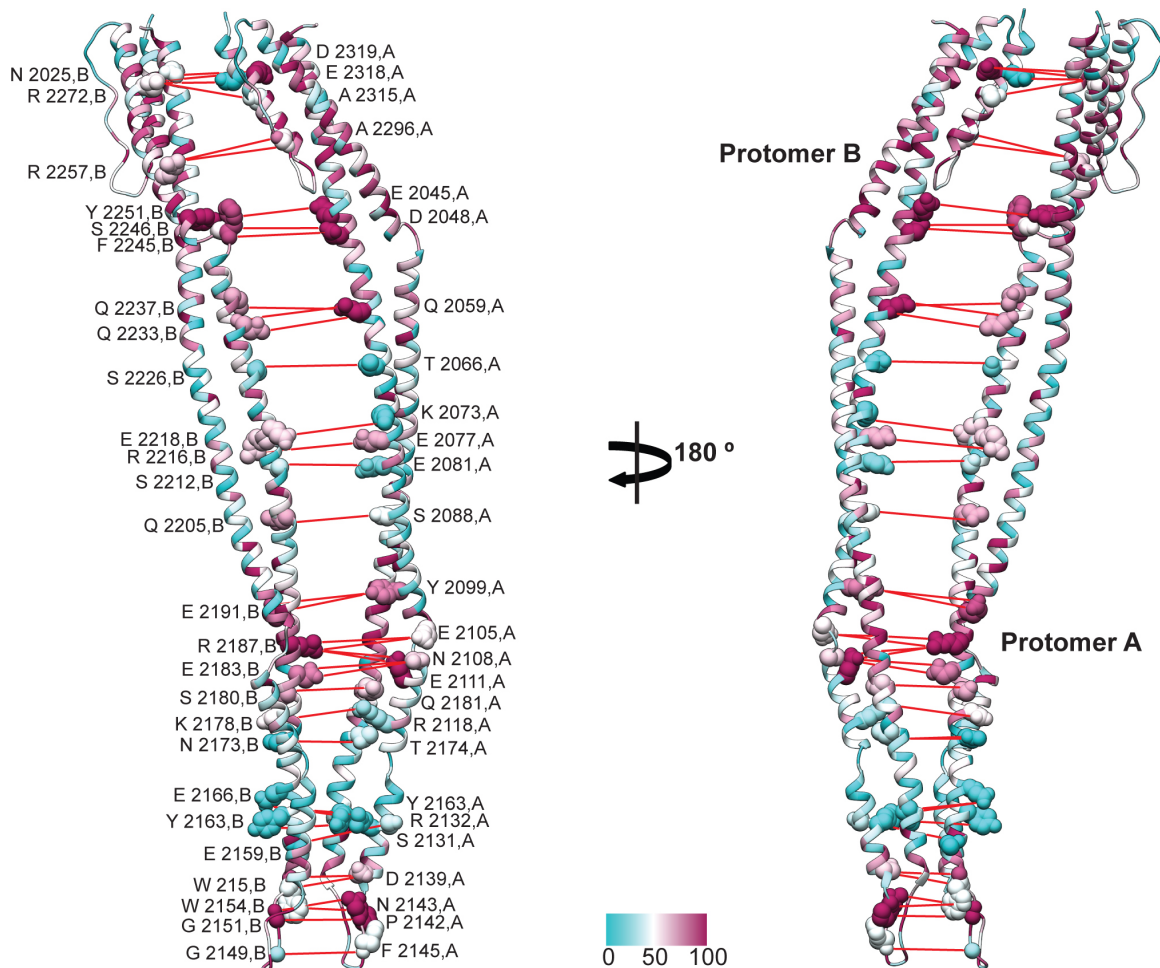


Abb. 27: Selektivität und Durchmesser des TcdA1-Translokationskanals

Positiv- (blau) sowie negativ-geladene (rot) Aminosäuren, die in den TcdA1-Translokationskanal hineinragen (links), weisen auf einen alternierenden Selektivitätsfilter hin, der durch hoch konservierte (zwei Sterne), konservierte (ein Stern) und nicht konservierte (kein Stern) Bereiche beschrieben wird. Der Kanal- bzw. Porendurchmesser (Skala rechts) nimmt von oben nach unten ab und verengt sich bei Tyrosin 2163 auf 3,9 Å, das den Kanal für entfaltete Proteine undurchlässig macht (vergrößerte Ansicht).

Die  $\alpha$ -Helices winden sich im Uhrzeigersinn über eine Länge von 200 Å in einem 180° Winkel. Der Innendurchmesser des Kanals verringert sich vom oberen zum unteren Ende von circa 15 Å auf 3,9 Å (Abb. 27). Da die Windung der coiled-coil Struktur sich nicht kontinuierlich über die komplette Länge des Kanals erstreckt, sondern die Ganghöhe am oberen bzw. am unteren

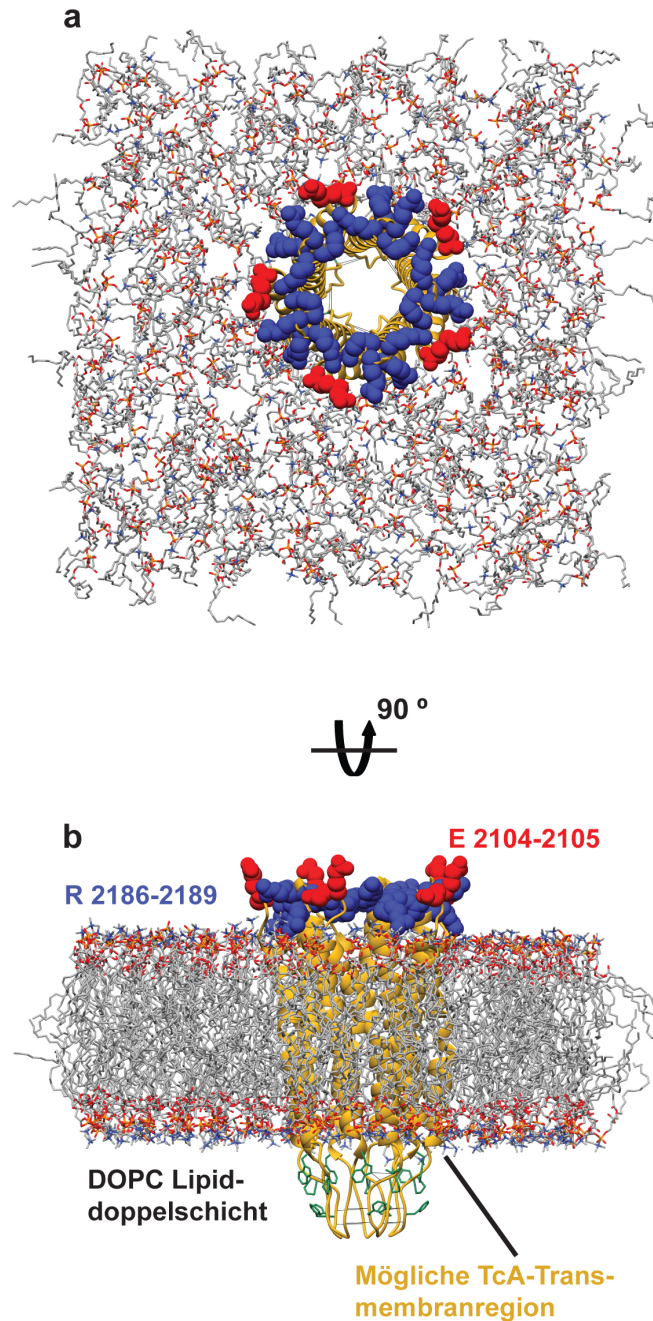


**Abb. 28: Konservierungsgrad und Interaktionsfläche von Aminosäuren zweier benachbarter porenbildender Domänen in einem TcdA1-Pentamer**

Der Grad der Aminosäurekonservierung (0 bis 100 %) wird anhand interagierender Aminosäuren in zwei benachbarten Protomeren A und B der Poren-bildenden Domäne verglichen. Interagierende Aminosäuren werden nach dem Kugelmolekülmodell dargestellt

Ende kleiner ist als in der Mitte des Kanals, vergrößert sich der Innendurchmesser des Kanals zuerst auf circa 25 Å und verringert sich dann erst auf einen Durchmesser von 3,9 Å am unteren Ende (Abb. 27). An dieser Stelle verschließen fünf Tyrosine (Y2163) den Kanal und machen ihn aufgrund von sterischen Hinderungen undurchlässig für eine Polypeptidkette (Abb. 27).

Diese Beobachtung bestätigt das Tc-Toxin-Translokationsmodell von Gatsogiannis et al., das eine Übertragung von TccC3 erst nach einer Konformationsänderung von TcdA1 in den Porenzustand ermöglicht (Gatsogiannis et al., 2013). Der Durchmesser des



**Abb. 29: Simulation der TcdA1-Transmembranregion in einer künstlichen DOPC-Membran**

Die mögliche Transmembranregion (gelb) von TcdA1 (AS 2104-2190), dargestellt in (a) Auf- und (b) Seitenansicht, ist mit Hilfe einer Moleküldynamiksimulation in eine homogene DOPC Lipiddoppelschicht mit den Ausmaßen 115 Å x 115 Å x 40 Å eingebettet worden. Die oberhalb der Lipiddoppelschicht rausragenden Glutamate (E) 2104-2105 (rot) sowie Arginine (R) 2186-2189 (blau) werden in Molekülkugelform dargestellt. Die unterhalb rausragenden hydrophoben Aminosäuren sind in grün hervorgehoben.



Translokationskanals, selbst an seiner größten Ausdehnung ist zu gering, um die ADP-Ribosyltransferase C3 in gefaltetem Zustand zu transportieren. D.h. das Protein muss entfaltet werden bevor es transloziert wird.

Im Translokationskanal bilden beide  $\alpha$ -Helices einer porenbildenden Domäne intra- und intermolekulare Wechselwirkungen über Wasserstoff- und Salzbrücken mit Nachbardomänen aus. (Abb. 28; Anhang, Tab. 13). Diese Wechselwirkungen stabilisieren den Kanal und dichten diesen nach außen ab. Dadurch ist er sehr statisch bzw. rigide. Dies wird ebenfalls durch niedrige B-Faktoren in diesem Bereich bestätigt (Anhang, Abb. 51).

Im oberen Bereich wird der zentrale Kanal zusätzlich durch fünf 20 Å lange  $\alpha$ -Helices stabilisiert (Abb. 26, rot). Der C-terminale Bereich von TcdA1 faltet sich in die TcB-bindende Domäne (Abb. 26, grün). Diese Domäne bildet eine fünffach-symmetrische flache Trichterstruktur aus, die Homologien zu Furin- bzw. Kexin-P-Domänen aufweist (Abb. 20, Reihe 6, Zeile 3 und 4). P-Domänen werden in der Literatur keiner bekannten Funktion zugeordnet. Diese Domäne bindet TcB (s.u.).

Im unteren Bereich des zentralen Kanals (AS 2104-2190) konzentrieren sich eine Vielzahl von hydrophoben Aminosäuren auf der Oberfläche (Abb. 30b). Desweiteren ist dieser Bereich fast nicht geladen (Abb. 30c). Daraus lässt sich schließen, dass dies die mögliche TcdA1-Transmembranregion ist, die in die Membran inseriert (Gatsogiannis et al., 2013).

Eine Moleküldynamiksimulation des TcdA1-Translokationskanals eingebettet in eine homogene DOPC Lipiddoppelschicht zeigt, dass der hydrophobe Bereich des Kanals genau den Durchmesser einer biologischen Membran besitzt (Abb. 29). Am unteren Ende der möglichen Transmembranregion verbindet ein Loop die beiden  $\alpha$ -Helices einer porenbildenden Domäne (Abb. 22). Dieser Loop besteht aus zehn Aminosäuren und ist extrem hydrophob (Abb. 29b). Diese Hydrophobizität würde sehr wahrscheinlich den Loops ermöglichen, spontan in die Lipiddoppelschicht einzudringen und nach der Theorie von Tanford über einen Entropie-gesteuerten Mechanismus, der auch als hydrophober Effekt bezeichnet wird, den übrigen Anteil der restlichen Transmembranregion mit sich ziehen (Tanford, 1980).

Oberhalb der vermeintlichen Transmembranregion und Lipiddoppelschicht erstrecken sich insgesamt 20 Arginine (R 2186-2189) und 10 Glutamate (E 2104-2105) nach außen (Abb. 29b) und formen einen geschlossenen Ladungsring (Abb. 25a). Dieser Ring könnte während der Penetration der Lipiddoppelschicht ein zu weites Durchdringen des Translokationskanals

verhindern. Zudem könnten die im Durchschnitt positive Ladung dieses Rings die Pore in der Membran stabilisieren, in dem er mit der negativen Oberfläche der Membran interagiert.

### 5.1.7 Der Translokationskanal arbeitet kationenselektiv und zeigt eine Homologie zur Anthraxtoxinpore

Der Innenraum des TcdA1-Translokationskanals ist hauptsächlich negativ geladen, besitzt aber im oberen und mittleren Bereich einige konservierte positive Ladungen, die dort eine alternierende Ladungsverteilung erzeugen (Abb. 30c). Der Hauptanteil der Ladungen innerhalb des Kanals ist in der Gruppe der Tc-Toxine konserviert und lässt eine generelle Funktion bei der Translokation von C3 vermuten (Abb. 27 und 28). *Black lipid bilayer* Experimente zeigen ebenfalls, dass der TcdA1-Translokationskanal kationenselektiv arbeitet (Lang et al., 2013).

Zwei wichtige Fragen sind: wie wird die ADP-Ribosyltransferase entfaltet und wie wird sie anschließend transloziert?

Beim Anthraxtoxin, dessen Kanal ebenfalls kationenselektiv ist (Blaustein et al., 1989), wird vermutet, dass der pH-Gradient zwischen Endosom und Cytoplasma die treibende Kraft für die Translokation ist. Es wird angenommen, dass der zu translozierende *lethal factor*, der negativ geladen ist, an der Oberfläche der *protective antigen*-Pore entfaltet wird und danach durch die Ansäuerung positiv geladen durch den kationenselektiven Kanal transportiert wird. Im Cytoplasma würde es durch den höheren pH-Wert zu einer Ladungsumkehr kommen und der Transport deshalb über einen Brown'schen Zahnradmechanismus getrieben werden (Feld et al., 2012).

Ich konnte in meiner Arbeit zeigen, dass die ADP-Ribosyltransferasedomäne C3 am N-Terminus mittels einer intrinsischen Aspartatproteasedomäne von TccC3 abgespalten wird und in einer wahrscheinlich entfalteten Form in TcdB2-TccC3 vorliegt (genauer siehe Abschnitt 5.2). Im Gegensatz zum *lethal factor* des Anthraxtoxins besitzt C3 einen isoelektrischen Punkt von 9,68 und könnte deshalb ohne einen pH-Gradienten direkt als kationisches Substrat durch den TcdA1-Translokationskanal in die Wirtszelle transloziert werden. Im Falle des Tc-Toxins wird keine Richtungsvorgabe eines Brown'schen Zahnradmechanismus durch einen  $\Delta$  pH gebraucht, da das TcdB2-TccC3-Fusionsprotein den endosomalen Bereich von TcdA1 verschließt. Es gibt also nur eine Richtung, in der die ADP-Ribosyltransferase den Kanal verlassen kann. Zusätzlich sorgen wahrscheinlich Faltungshelfer (z.B. Hsp90) im Cytoplasma für die entsprechende Triebkraft der Translokation (Lang et al., 2013).



**Abb. 30: Konservierung, Hydrophobizität und elektrostatisches Potential des TcdA1-Translokationskanals**

Die Oberfläche des Translokationskanal ist in (a) nach dem Grad der Aminosäurekonservierung (0 bis 100 %), in (b) nach der Hydrophobizitätsanalyse von Hessa et al. 2005 (in Hydrophobizitätseinheiten von -0.6 = hydrophob bis 3.5 = hydrophil) sowie in (c) nach der Berechnung des elektrostatischen Coloumbpotentials bei pH 7 (-12 bis +12 kcal/mol) von oben (obere Zeile) von der Seite (mittlere Zeile) und seitlich zentral geschnitten (untere Zeile) dargestellt.

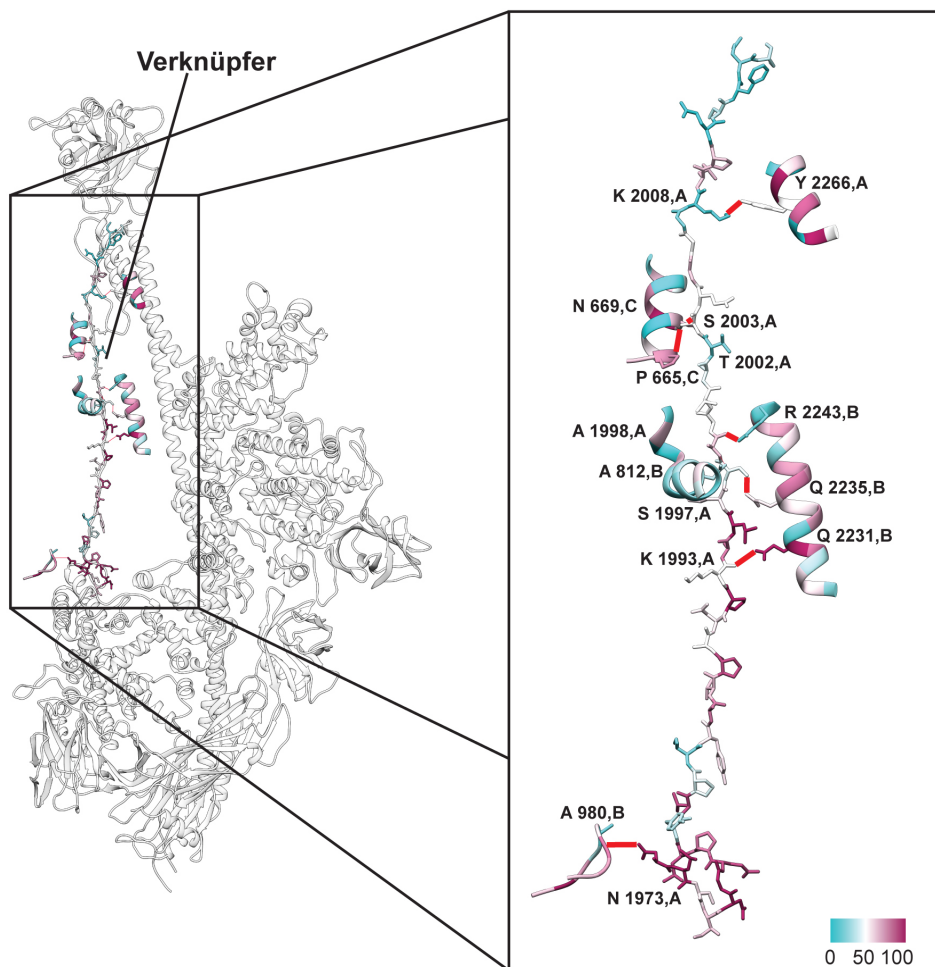
**Zusammenfassung: Der Translokationskanal von TcdA1**

Der TcdA1-Translokationskanal besitzt eine rigide Struktur, die aus jeweils fünf porenbildenden und fünf TcB-bindenden Domänen aufgebaut ist. Die Variation der intramolekularen Windung der zehn  $\alpha$ -Helices über die komplette Länge des Kanals führt zu einer Änderung des Innendurchmessers. Generell nimmt der Innendurchmesser vom oberen zum unteren Ende ab. Im unteren Bereich verschließen fünf Tyrosine den Kanal. Der Kanal zeigt eine Selektivität für

kationische Substrate wie die ADP-Ribosyltransferase C3 und lässt einen eigenen speziellen pH-unabhängigen Translokationsmechanismus vermuten.

### 5.1.8 Die Verknüpfersdomäne verbindet die äußere Hülle mit dem Translokationskanal in einer unnatürlichen Konformation

Die Verbindung zwischen äußerer Hülle und Translokationskanal in TcdA1 bildet die Verknüpfersdomäne (Abb. 21a), die aus 45 Aminosäuren besteht und eine gestreckte unnatürliche Konformation aufweist. Sie zeigt keine Homologien zu bekannten Strukturen und würde nach Sekundärstrukturvorhersagen eine  $\alpha$ -helikale Struktur einnehmen. Die Konservierung vereinzelter Aminosäuren beschreibt eine mögliche Homologie zu anderen A-



**Abb. 31: Konservierungsgrad und Interaktionsfläche von Aminosäuren einer Verknüpfers-Domäne mit Aminosäuren benachbarter TcdA1-Präporenprotomere**

Darstellung der Aminosäuren der Verknüpfersdomäne und deren interagierenden Aminosäuren in benachbarten TcdA1-Protomeren nach dem Grad der Konservierung (0 bis 100 %).

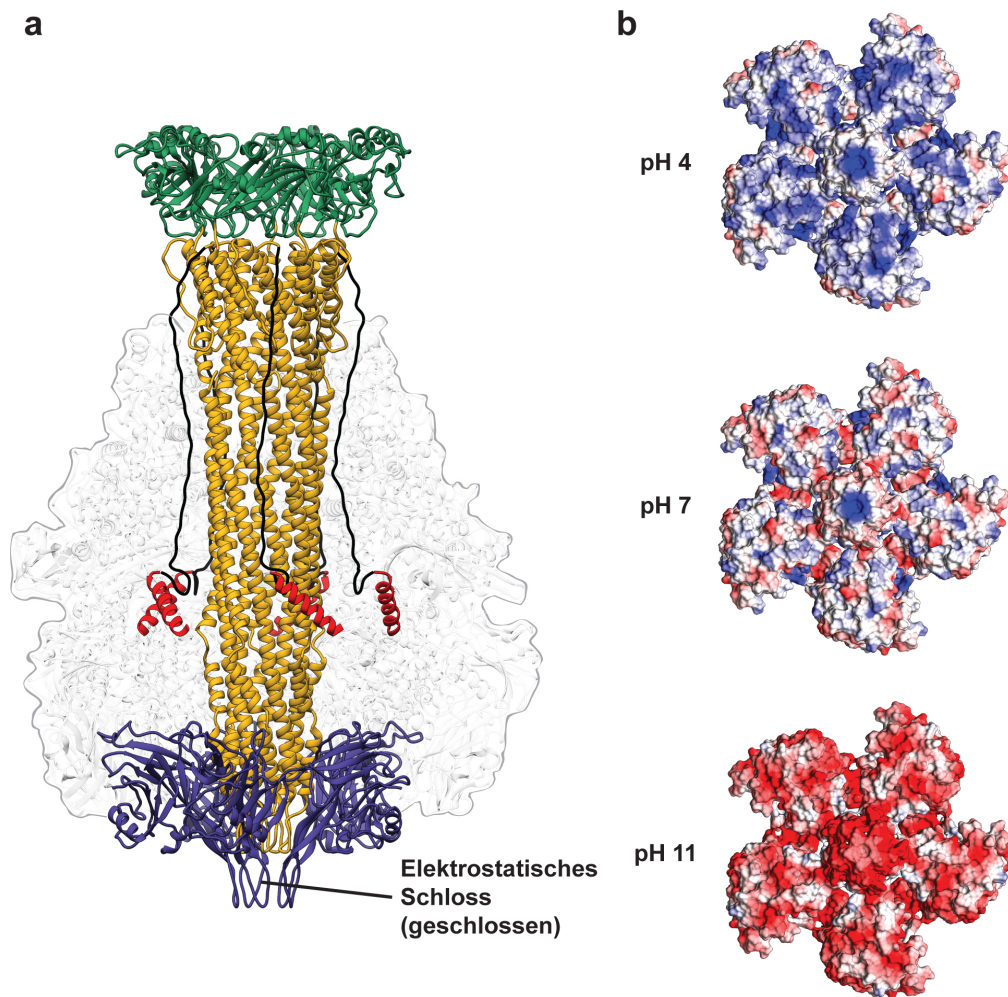
Komponenten, obgleich die Interaktionsfläche der Verknüpfedomäne zu Domänen aus Nachbarprotomeren nur mäßig konserviert ist (Abb. 31; Anhang, Tab. 14).

Auffällig ist der hohe Anteil an Prolinen mit 11,1 % in der Verknüpf-Domäne im Vergleich zu 3,7 % in einem gesamten TcdA1-Protomer. Da Proline aufgrund ihres äquivalenten Vorkommens in cis- wie auch trans-Konfigurationen die Fähigkeit besitzen,  $\alpha$ -helikale- wie auch  $\beta$ -Falblatt-Strukturen zu unterbrechen, könnten sie einerseits die gestreckte Konformation der Verknüpfedomäne in der TcdA1-Präpore stabilisieren. Andererseits könnten Proline helfen, die Konformation der Verknüpfedomäne bei einem Übergang in die TcdA1-Pore in eine bestimmte Struktur zu erzwingen.

### 5.1.9 Eine pH-Änderung öffnet möglicherweise ein „elektrostatisches Schloss“ im neuraminidaseähnlichen Pentamer

Die Konformationsänderung von einer TcdA1-Präpore zu einer TcdA1-Pore ist pH-abhängig und wird bei extremen pH-Werten, das heißt bei pH 4 oder pH 11, induziert (Gatsogiannis et al., 2013). Für diese Konformationsänderung müsste sich zuerst die äußere Hülle am unteren Ende des neuraminidaseähnlichen Pentamers (Abb. 32a) öffnen. Eine Analyse der elektrostatischen Ladungsverteilung des neuraminidaseähnlichen Pentamers zeigt bei pH 7 eine homogene Ladungsverteilung, die wie ein elektrostatische Schloss die Hülle verschlossen halten. Bei pH 4 und 11 hingegen kommt es zu starken Abstoßungen, die das Schloss entsprechend öffnen könnten (Abb. 32b).

Zum Beispiel interagieren bei physiologisch relevanten pH-Wert die Hydroxyphenylgruppen von Tyr1188 mit der Hydroxylgruppe des Nachbar-Tyrosins im Peptidrückgrat und stabilisieren so das Pentamer ( $pI_{\text{Tyrosin}} = 5,66$ ). Diese elektrostatische Interaktion wird bei einem pH größer als 10 bzw. kleiner als 4 durch Deprotonierung des Tyr1188 an dessen Hydroxyphenylgruppe ( $pK_s = 10,07$ ) bzw. durch Protonierung an dessen Hydroxylgruppe des Peptidrückgrats ( $pK_s = 2,20$ ) aufgehoben und dadurch wird das Pentamer destabilisiert.



**Abb. 32: pH-abhängige Ladungsänderungen im Neuraminidase-ähnlichen Pentamer der TcdA1-Präpore**

(a) Die Neuraminidase-ähnliche Domäne (dunkelblau) bildet in der TcdA1-Präpore ein Pentamer aus, das (b) bei physiologisch relevantem pH-Wert (pH 7) über elektrostatische Wechselwirkungen zusammengehalten wird. Eine Veränderung des Protonierungszustands zu pH 4 und pH 11 führt zur Ausbildung gleicher bzw. abstoßender Ladungen und lässt vermuten, dass ein „elektrostatisches Schloss“ die TcdA1-Präpore bei pH 7 verschließt und dass dieses Schloss sich möglicherweise in der TcdA1-Pore bei pH 4 und pH 11 öffnet.

Das Prinzip eines „elektrostatischen Schlosses“ wurde schon bei den Proteinen *major ampullate spidroin* (MaSp) 1 und MaSp2 beschrieben. Diese sind für die Bildung von Spinnenfäden in der Spinnengattung *Euprosthenoops* verantwortlich. Hierbei kommt es zu einer Dimerisierung beider Proteine bei einem pH kleiner als 6,4, wofür eine Protonierung von einem an der Oberfläche exponierten Aspartat und Glutamat verantwortlich ist (Landreh et al., 2010).

---

## 5.2 TcdB2-TccC3-Fusionsprotein

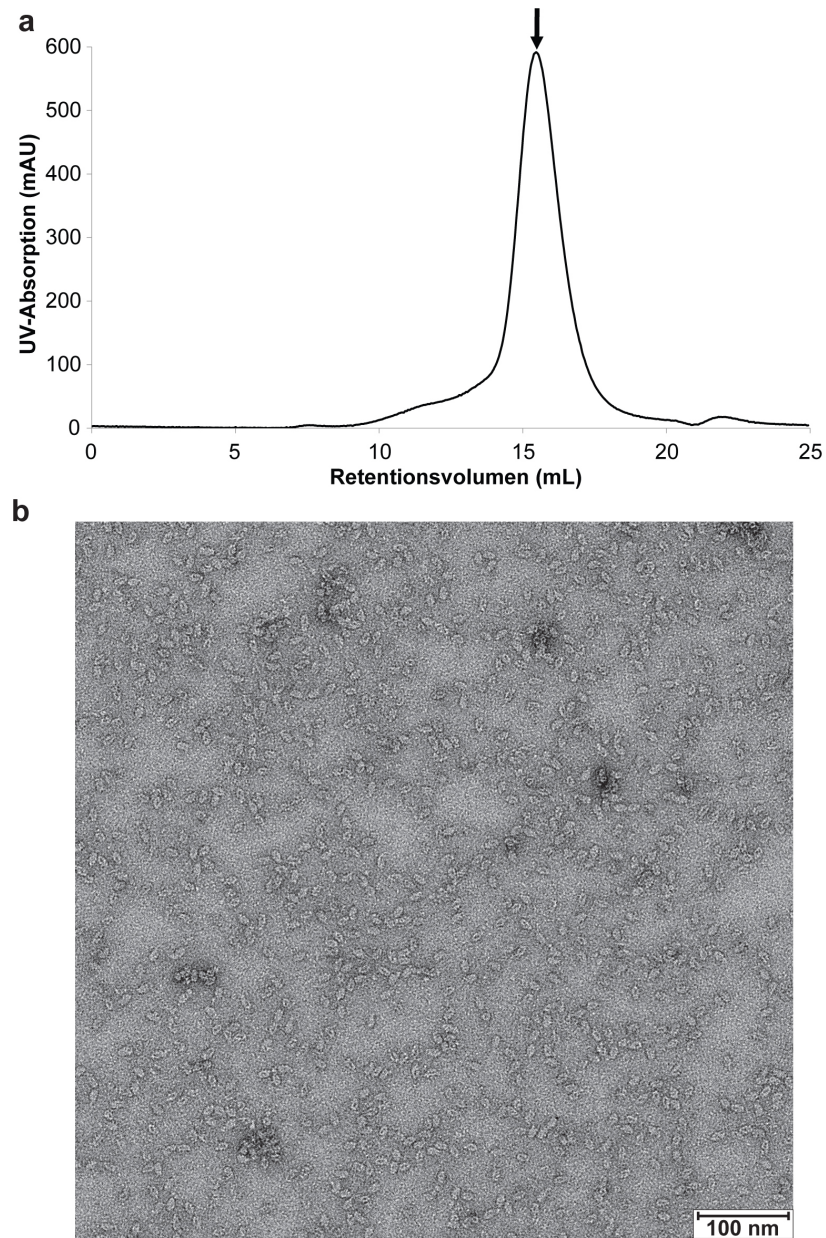
Um detailliertere Einblicke in den Mechanismus der Übertragung der ADP-Ribosyltransferase C3 zu erhalten, wurden zunächst TcdB2 und TccC3 strukturell analysiert.

TcdB2 bzw. TccC3 weisen eine mäßige bzw. sehr geringe Expressionsrate auf und liegen nach Proteinproduktion zum Großteil in Einschlusskörpern vor. Ein TcdB2-TccC3-Fusionskonstrukt wurde von unseren Kollaborationspartnern für die Erhöhung der Löslichkeit generiert, das beide Proteine mittels eines flexiblen aus fünf Aminosäuren bestehenden Linkers verbindet (Lang et al., 2010). Das TcdB2-TccC3-Fusionsprotein zeigt eine mäßige Expressionsrate aber eine verbesserte Löslichkeit und wurde für weiterführende proteinkristallographische Experimente von Alexander Lang, Universität Freiburg zur Verfügung gestellt.

### 5.2.1 Strukturbestimmung des TcdB2-TccC3-Fusionsproteins

Für die Aufreinigung des TcdB2-TccC3-Fusionsproteins wurden eine Metallaffinitätschromatographie wurde von Dr. Alexander Lang durchgeführt und das Protein danach eingefroren. Nach dem Auftauen habe ich das Protein mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt. Das Fusionsprotein eluierte von einer Superose 6 10/300 GL Säule in einem monodispersen Kurvenverlauf bei einem Retentionsvolumen von 15,5 mL, das einem Molekulargewicht von etwa 250 kDa entspricht (Abb. 33a). Eine elektronenmikroskopische Aufnahme zeigte bei Negativkontrastierung homogen verteilte TcdB2-TccC3-Einzelmoleküle (Abb. 33b).

Kristallisationsexperimente mit dem gereinigten TcdB2-TccC3-Fusionsprotein führten nach circa drei Tagen zum Wachstum von reproduzierbaren Proteinkristalle in zwei Kristallisationsbedingungen (Anhang, Abb. 54). Die Proteinkristalle aus Bedingung 1 (Anhang, Abb. 54a) diffraktierten an einer hausinternen Röntgenquelle nach Kryokonservierung (25%ige Glycerinlösung in TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer I) bis etwa 3 Å, wohingegen Proteinkristalle aus Bedingung 2 (Anhang, Abb. 54b) nach Kryokonservierung (25%ige Glycerinlösung in TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer II) nur Röntgenreflexe bis circa 6 Å aufwiesen. Da keine homologen Proteinstrukturen existierten, um ein TcdB2-TccC3-Modell über molekularen Ersatz zu erhalten, wurden Proteinkristalle aus Bedingung 1 in jeweils drei unterschiedlichen Quecksilber- und Platinlösungen für eine Schwermetallderivatisierung inkubiert.



**Abb. 33: Reinigung und elektronenmikroskopische Analyse von TcdB2-TccC3**

TcdB2-TccC3 eluiert bei pH 8 in monomerer Form während einer (a) Größenausschlusschromatographie (Superose 6 10/300 GL). Der monodisperse Kurvenverlauf weist ein Absorptionsmaximum bei 15,5 mL Retentionsvolumen auf (schwarzer Pfeil), das einem Molekulargewicht von etwa 250 kDa entspricht. (b) Eine elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt homogen verteilte TcdB2-TccC3-Einzelmoleküle. Die Maßstabskala entspricht einer Längeneinheit von 100 nm.

Das TcdB2-TccC3-Fusionsprotein besteht aus 2473 Aminosäuren, in dem 14 Cysteine, 32 Methionine und 62 Histidine enthalten sind. Quecksilber gehört in die Schwermetallklasse B und bindet kovalent an Thiolgruppen von Cysteinresten (Agniswamy et al., 2008). Platin gehört wie auch Quecksilber in die Klasse B der Schwermetallderivate, bindet aber kovalent an die Sulfhydrylgruppen von Methioninen und an den Imidazolring von Histidinen (Boggon und

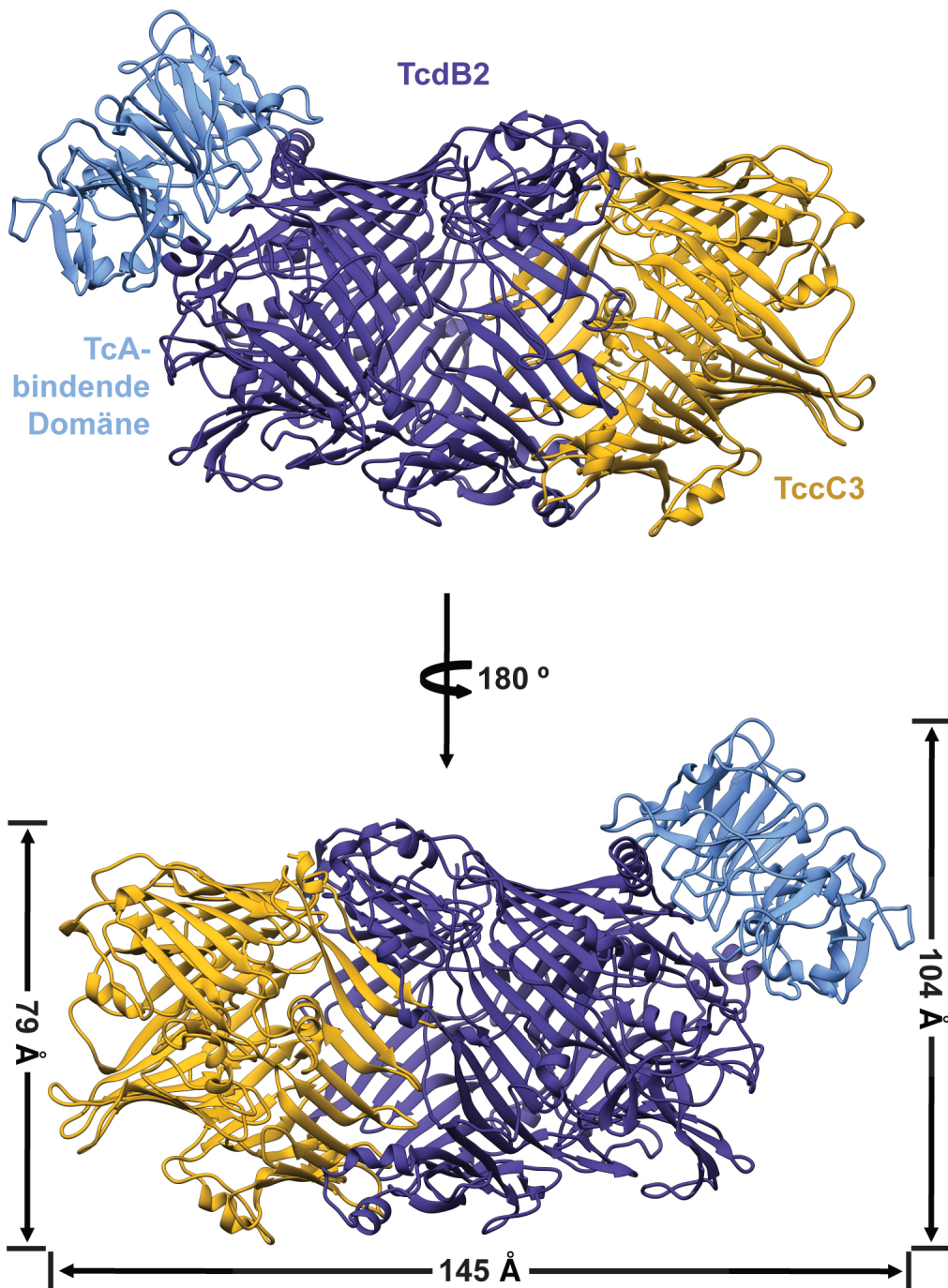


Shapiro, 2000). Für alle sechs Schwermetalllösungen wurden bei der jeweiligen Röntgenabsorptionskante für Quecksilber und Platin ein redundanter Datensatz am Elektronenbeschleuniger (SLS, Villingen, Schweiz) aufgenommen (Anhang, Tab. 15). Für den besten diffraktierenden Kristall (Thimerosal-derivatisiert) wurde bei einer Auflösung von 2,35 Å (Anhang, Abb. 55a) eine Einheitszelle mit den Ausmaßen 232 Å, 232 Å und 143 Å in einem Kristallgitter der primitiven hexagonalen Raumgruppe  $P3_221$  berechnet (Anhang, Abb. 56). Die kristallographischen Phasen wurden mit Hilfe eines  $K_2Pt(NO_2)_4$  derivatisierten Proteinkristalls erhalten, der bis zu einer Auflösung von 3,25 Å diffraktierte (Anhang, Abb. 55b) und aus denselben Einheitszell- und Raumgruppenparameter aufgebaut ist (Anhang, Tab. 15). Das primitive hexagonale Kristallgitter zeigt in dessen Einheitszellen jeweils ein TcdB2-TccC3-Fusionsprotein in der asymmetrischen Einheit (Anhang, Abb. 56).

Die experimentellen Phasierungsansätze führten mit Hilfe der anomalen Platinintensitäten zu einer homogen verteilten Elektronendichte in den  $\beta$ -Faltblatt-Bereichen des TcdB2-TccC3-Außenskeletts (Anhang, Abb. 57). Durch eine graduelle Verfeinerung der Elektronendichte konnte eine finale Struktur des TcdB2-TccC3-Fusionsproteins mit einem  $R_{work}$  von 20,64 % und  $R_{free}$  von 22,26 % modelliert werden (Anhang, Abb. 57; Anhang, Tab. 15).

### 5.2.2 Das TcdB2-TccC3-Heterodimer beschreibt ein nicht klassisches RHS-Protein

TcdB2 und TccC3 bilden einen heterodimeren Komplex mit einer kokonähnlichen hohlen Struktur (Abb. 34). Der gesamte Kokon besteht aus 90 antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern, die ein langes  $\beta$ -Sheet spiralförmig auf- und abwinden und somit eine kokonähnliche Struktur induzieren. Hierbei wird der Kokon zu 60 % aus dem C-terminalen Bereich von TcdB2 (AS 103-379, 693-1469; Abb. 34, dunkelblau) und zu 40 % aus dem N-terminalen Bereich von TccC3 (AS 1-590; Abb. 34, gelb) gebildet. Der N-terminale Bereich von TcdB2 faltet sich in eine  $\beta$ -Propeller-Struktur (AS 380-692; Abb. 34, hellblau), die in einem Winkel von etwa 45° auf dem C-Terminus von TcdB2 steht und das TcdA1-proximale Ende des Kokons verschließt. Am TcdA1-distalen Ende des Kokons (AS 590) stülpt sich eine kleine Domäne (AS 591-678) in dessen Innenraum und verschließt somit den Kokon an diesem Ende. Die ADP-Ribosyltransferase C3 ist in der Kristallstruktur nicht aufgelöst.

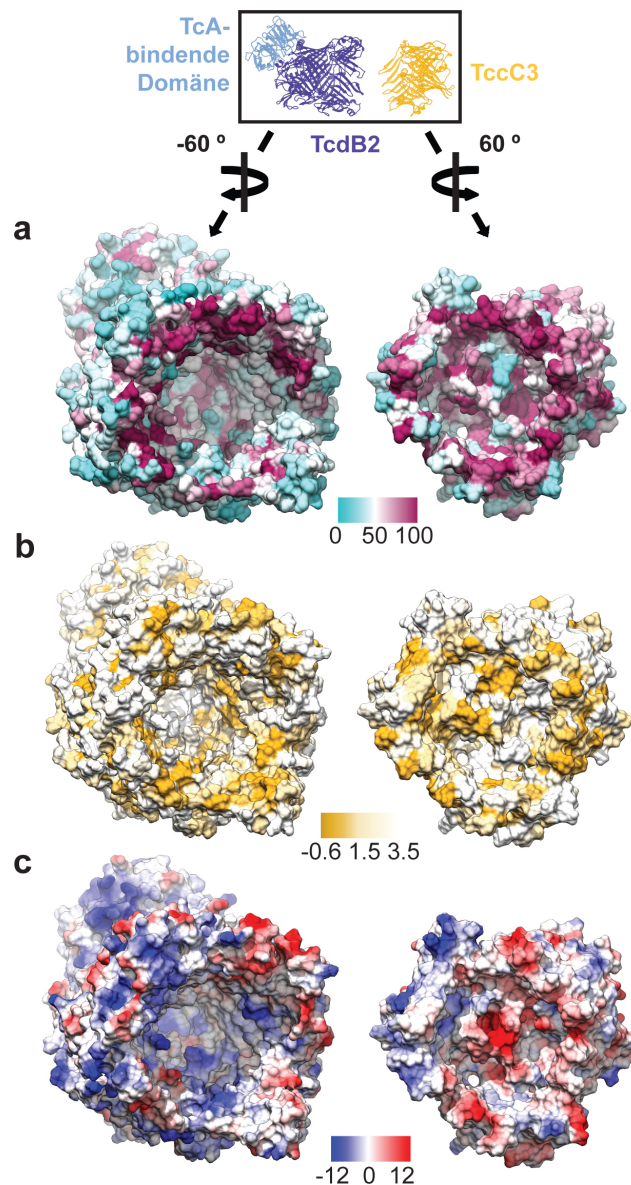


**Abb. 34: Atomare Struktur des TcdB2-TccC3 Heterodimers**

Das Heterodimer besteht aus TcdB2 und TccC3 (gelb), die zusammen eine Kokonförmige Struktur ausbilden. Innerhalb von TcdB2 (dunkelblau) faltet sich eine  $\beta$ -Propeller-Struktur bzw. die TcA-bindende Domäne (hellblau).

An der Grenzfläche von TcdB2 und TccC3 sitzen circa 200 Aminosäuren, die zum Großteil konserviert sind (Abb. 35a; Anhang, Tab. 16). Die interagierenden Aminosäuren sind an elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt, wodurch ein stabiles TcdB2-

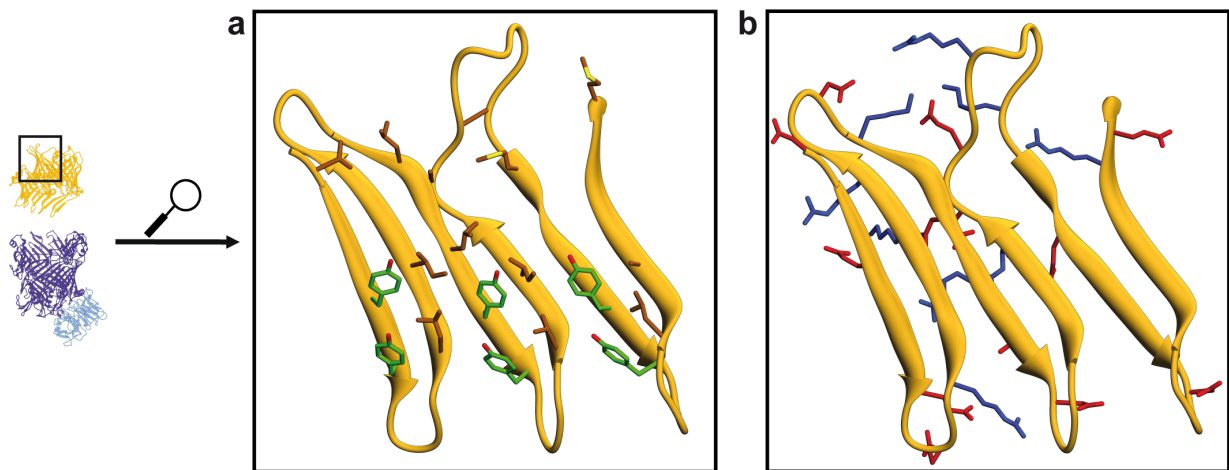
TccC3-Heterodimer aufgebaut wird (Abb. 35b und c). Diese Interaktion ist sicherlich auch der Grund für die verbesserte Löslichkeit des Fusionsproteins gegenüber den einzelnen Proteinen. Zusätzlich liegt der C-Terminus von TcdB2 nur 4 Å von dem N-Terminus von TccC3 entfernt, wodurch deren Expression als Fusionsprotein möglich war. Interessanterweise werden die beiden Proteine als natürliche Fusionen in *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rodococcus* oder *Burkholderia* (Abb. 6 und 7) von einem Gen kodiert (Hincliffe et al., 2010).



**Abb. 35: Physikalische Eigenschaften der Interaktionsfläche zwischen TcdB2 und TccC3**

Darstellung der Interaktionsfläche zwischen TcdB2 und TccC3 (a) nach dem Grad der Aminosäurekonservierung (0 bis 100 %), (b) nach einer Hydrophobizitätsanalyse nach Hessa et al. 2005 (-0,6 = hydrophob bis 3,5 = hydrophil) sowie (c) nach Berechnung des elektrostatischen Coloumbpotentials bei pH 7 (-12 bis +12 kcal/mol).

Während der bioinformatischen Analyse von TcdB2 und TccC3 wurde eine sich wiederholende Sequenzabfolge im C-terminalen Bereich von TcdB2 sowie N-terminalen Bereich von TccC3 entdeckt. Diese Sequenzabfolge beschreibt die YD-Repeatsequenz (GxxxRYxYDxxGRL(I/T)) (Feulner et al., 1990), die vorwiegend in *rearrangement hotspot* (RHS) Proteinen und Teneurinen nachgewiesen wurden (Lin et al., 1984; Minet et al., 1999). In RhsA von *Escherichia coli* findet man 28 dieser YD-Repeats, aber in leicht abgewandelter Sequenzabfolge (Hill et al., 1994), wobei die vorangehende RY- und die nachfolgende GRL-Sequenz nur gering konserviert sind. Bei einer klassischen Betrachtungsweise ergeben sich daher nur 18 YD-Repeats (Anhang, Abb. 58).

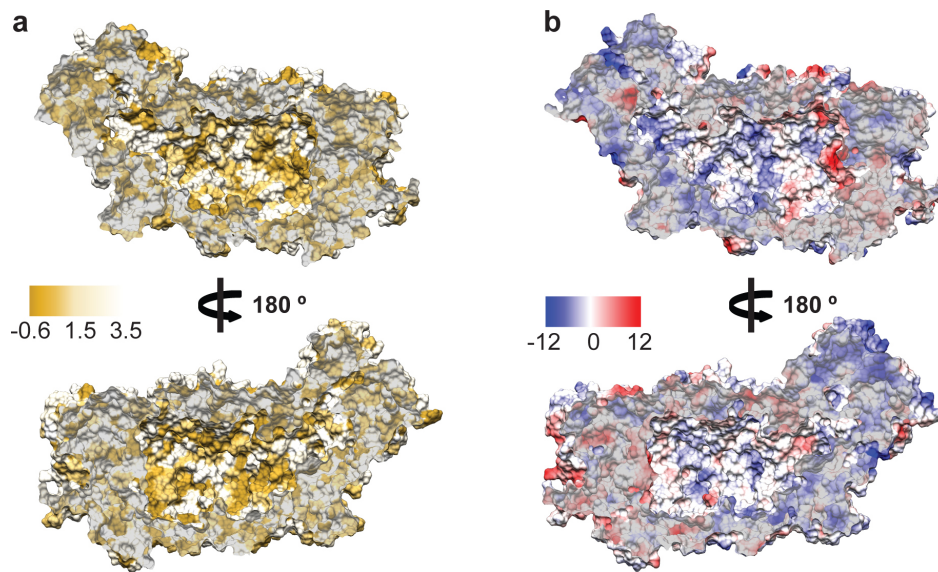


**Abb. 36: Verteilung von hydrophoben und geladenen Aminosäuren in jeweils drei RHS-Repeat-Motiven bei TccC3**

Darstellung von jeweils drei RHS-Repeat-Motiven. Die Ansicht erfolgt vom Kokoninnenraum auf die Kokoninnenwand und zeigt (a) zwei konservierte Tyrosine (grün) pro RHS-Repeat und hydrophobe Aminosäuren (braun), die in den Kokoninnenraum ragen. (b) Nahezu alle positiv (blau) und negativ (rot) geladenen Aminosäuren liegen an der Außenseite des Kokon und sind hin zum Lösemittel ausgerichtet.

TcdB2 bzw. TccC3 besitzen jeweils drei bzw. neun klassische YD-Repeats (Anhang, Abb. 59). Diese RHS-Repeats bestehen aus zwei antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern, die über einen kurzen Loop miteinander verbunden sind (Abb. 32). Die zwei Tyrosine und fast alle hydrophoben Aminosäuren ragen in den Innenraum des Kokons (Abb. 36a). Geladene Aminosäure wie Arginin, Lysin, Glutamat und Aspartat sitzen vorwiegend an der Außenseite des Kokons sowie an den seitlichen Verbindungen des langen  $\beta$ -Sheets (Abb. 36b). Hierbei bilden sie aufgrund der spiralförmigen Anordnung elektrostatische Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen mit der Nachbarwindung des  $\beta$ -Sheets aus und stabilisieren

somit das Kokongerüst. Die an der Kokonaußenseite sitzenden Ladungen interagieren mit dem umgebenden wässrigen Milieu und halten das TcdB2-TccC3-Heterodimer in Lösung (Abb. 37b).



**Abb. 37: Physikalische Eigenschaften des Kokoninnenraums von TcdB2-TccC3**

Die Oberfläche des Kokoninnenraums von TcdB2-TccC3 zeigt (a), dargestellt nach einer Hydrophobizitätsanalyse nach Hessa et al. 2005 (-0,6 = hydrophob bis 3,5 = hydrophil), mehrere größere hydrophobe Stellen sowie (b), dargestellt nach Berechnung des elektrostatischen Coloumbpotentials bei pH 7 (-12 bis +12 kcal/mol), großflächig verteilte positive Ladungen. Diese lassen eine Entfaltungshelfer-ähnliche Funktion dies Kokons vermuten.

Wenn der Definition eines YD-Repeats mehr Freiraum gegeben wird, dann enthält ein TcdB2 bzw. TccC3 insgesamt 22 bzw. 15 YD-Repeats (Anhang, Abb. 59). Ein YD-Repeat (TIGRFAM TIGR01643) ist in seiner Sequenzabfolge in dem Motiv eines RHS-Repeats (Pfam PF05593) enthalten und beide zeigen denselben strukturellen Motivaufbau. Aufgrund der identischen Sequenzabfolgen von YD- und RHS-Repeats und des Vorkommens von nicht-klassischen RHS-Repeats in sowohl TcdB2 als auch TccC3, bilden beide Proteine zusammen ein RHS-ähnliches Protein. Bei dieser nicht-klassischen Betrachtungsweise ragen alle Tyrosine und hydrophoben Aminosäuren der insgesamt 37 YD-Repeats in den Innenraum des Kokons. Da 37 YD-Repeats aus 74 antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern bestehen und der gesamte Kokon aus 90  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut ist, ist die Kokoninnenwand kontinuierlich alternierend mit Tyrosinen und hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet (Abb. 37a). Der hydrophobe Innenraum

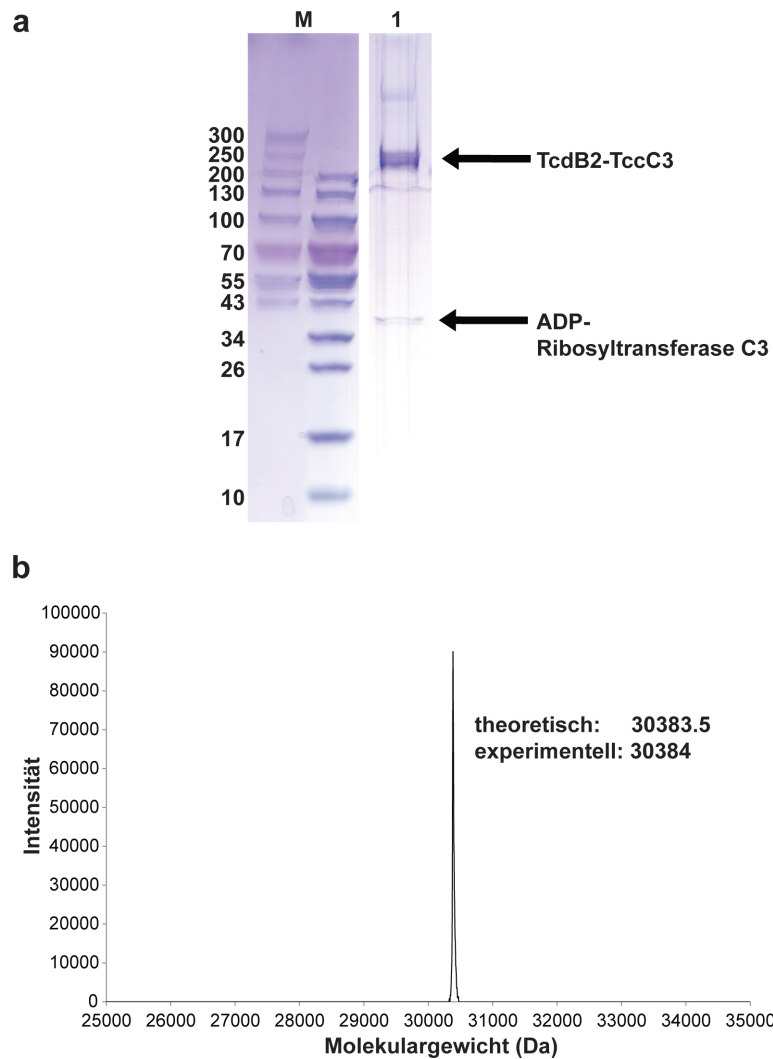
lässt vermuten, dass das TcdB2-TccC3-Heterodimer als ein nicht-klassisches RHS-Protein einen Entfaltungsraum für die ADP-Ribosyltransferase C3 bieten könnte.

Prokaryontische und eukaryontische Zellen besitzen eine Vielzahl an Faltungshelfern, um eine Aggregation von Proteinen und deren Ablagerung in der Zelle zu verhindern (Liberek et al., 2008; Hartl und Hayer-Hartl, 2009). Wenn ein entfaltetes Protein direkt nach dessen Entfaltung oder Translation ein fehlerhaftes Proteinaggregat ausbildet, kann dieses durch Auflösen des Aggregates gerettet werden. Dieser Prozess wird als nicht-destruktive Disaggregation bezeichnet und benötigt in Prokaryonten das Protein *caseinolytic peptidase B* (ClpB), das Proteinaggregate über einen ATP-abhängigen Entfaltungsmechanismus solubilisiert und anschließend mit Hilfe des prokaryontischen Faltungshelfers Dnak die korrekte Faltung der Proteine unterstützt (Goloubinoff et al., 1999; Motohashi et al., 1999). ClpB oligomerisiert als Hexamer und formt eine Pore, in die jeweils zwei Ringe bestehend aus sechs Tyrosinen (Tyr251 und Tyr653) hineinragen. Diese Tyrosine spielen eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung sowie bei der Entfaltung und Translokation des zuvor aggregierten Proteins (Schlieker et al., 2004; Doyle et al., 2012). Die in den Kokoninnenraum ragenden Tyrosine des TcdB2-TccC3-Heterodimers könnten die entfaltete ADP-Ribosyltransferase C3 an der Innenwand des Kokons stabilisieren. Diese Stabilisierung würde eine gerichtete Entfaltung induzieren und zusätzlich die Aggregation der ADP-Ribosyltransferase im Innenraum des Kokons verhindern, bevor diese nach Bildung des Holotoxinkomplexes in den TcdA1-Translokationskanal übertragen wird.

### **5.2.3 Die ADP-Ribosyltransferase C3 liegt im Kokoninnenraum von TcdB2-TccC3 in einer wahrscheinlich ungefalteten Form vor**

Um nachzuweisen, dass sich die ADP-Ribosyltransferase C3 im Kokoninnenraum während der Kristallisation befindet, wurden circa 15 TcdB2-TccC3-Kristalle mittels Probenpuffer und SDS denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 38a). Das mit Coomassieblau gefärbte SDS-Gel zeigt eine Proteinbande bei etwa 250 kDa, die dem Molekulargewicht des TcdB2-TccC3-Fusionsproteins entspricht und eine Proteinbande bei circa 35 kDa. Diese Proteinbanden wurden mittels Trypsin im Gel verdaut. Die aus dem Verdau resultierenden Peptide der kleineren 35 kDa Proteinbande konnten über eine HPLC-MS-Analyse eindeutig der Aminosäuresequenz der ADP-Ribosyltransferase C3 zugeordnet werden. Diese Analyse bestätigt, dass sich die ADP-Ribosyltransferase C3 in den Kristallen von TcdB2-TccC3 befindet.

Zusätzlich zeigt die Analyse, dass die ADP-Ribosyltransferase entweder vor oder nach Denaturierung mittels SDS von dem TcdB2-TccC3-Fusionsprotein abgespalten wurde.



**Abb. 38: Nachweis der ADP-Ribosyltransferase C3 im Kokon der Kristallstruktur von TcdB2-TccC3**

Nachdem ca. 15 Proteinkristalle von TcdB2-TccC3 denaturiert und (a) mittels SDS-PAGE analysiert wurden, führte ein tryptische Verdau und eine anschließende HPLC-MS-Analyse der 30 kDa-Bande zum Nachweis der ADP-Ribosyltransferase C3 am C-terminalen Ende von TccC3. Um zu zeigen, dass C3 im Kokon von TcdB2-TccC3 liegt, führte nach kurzem Erhitzen von TcdB2-TccC3 (b) eine ESI-MS-Analyse zum Nachweis von C3 mit einer Abweichung des experimentellen vom theoretischen Molekulargewichtes von 0,002 %.

Eine Abspaltung aufgrund einer Sensitivität gegenüber SDS scheint eher unwahrscheinlich. Daher sollte das Molekulargewicht von gereinigtem TcdB2-TccC3-Fusionsprotein mittels ESI-MS-Experimenten analysiert werden. Jedoch zeigten die Ergebnisse der Massenspektren keine Intensitäten für TcdB2-TccC3 oder für die ADP-Ribosyltransferase C3 im Massenbereich von

10 kDa bis 300 kDa. Anschließend wurde das TcdB2-TccC3-Fusionsprotein für 10 Sek. bei 95°C semidenaturiert. Eine sofortige ESI-MS-Analyse zeigte in einem Massenspektrum ein Signal bei einem Molekulargewicht von 30384 Da (Abb. 38b). Nach Lang et al. liegt das theoretische Molekulargewicht der ADP-Ribosyltransferase C3 von TccC3 (AS 679-960) bei 30383,5 Da (Lang et al., 2010). Das Ergebnis bestätigt, dass die ADP-Ribosyltransferase C3 vor der Denaturierung von TccC3 abgespalten wurde. Da die ADP-Ribosyltransferase C3 in den TcdB2-TccC3-Kristallen nachgewiesen werden konnte, wurde die Einheitszelle nach zusätzlicher Elektronendichte durchsucht. Jedoch wurde keine Elektronendichte außerhalb des TcdB2-TccC3-Kokons gefunden.

Die massenspektrometrischen Ergebnisse bekräftigen, dass sich die ADP-Ribosyltransferase C3 im Kokoninnenraum des TcdB2-TccC3-Heterodimers in einer wahrscheinlich ungefalteten Form befindet. Da keine zusätzliche Elektronendichte im Kokoninnenraum gefunden wurde, könnte die ADP-Ribosyltransferase während der Komplexbildung von TcdB2 und TccC3 durch einen unbekanntem Mechanismus abgespalten worden sein.

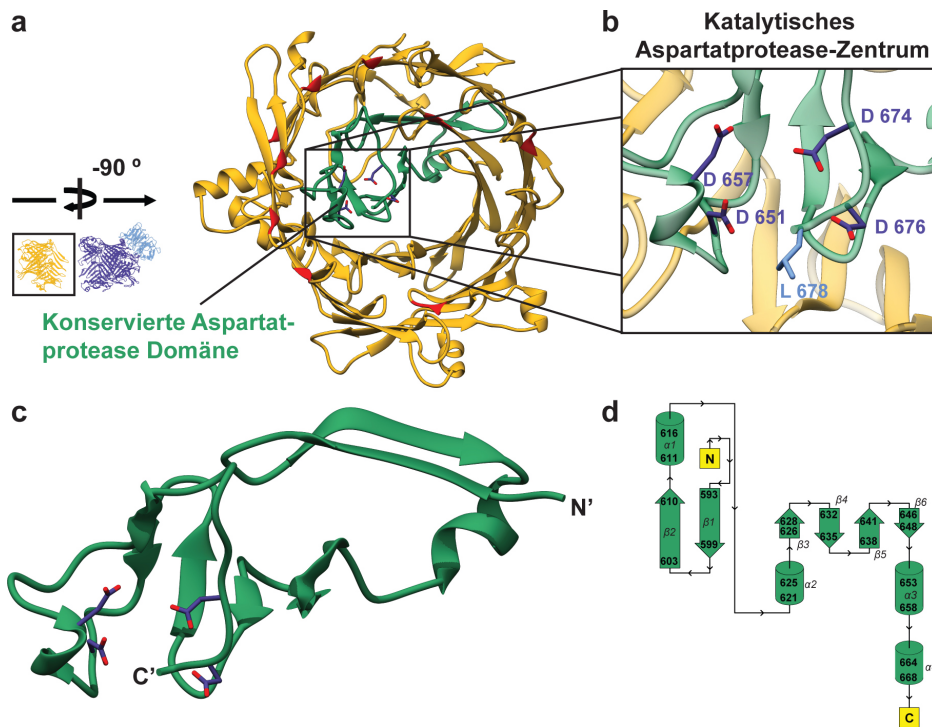
#### 5.2.4 TccC3 beherbergt eine intrinsische RHS-Aspartatprotease-Domäne

Der C-terminale Bereich von TcdB2 und der N-terminale Bereich von TccC3 bauen zusammen den Kokon des Heterodimers auf. Eine kleine Domäne (AS 591-678) stülpt sich am C-terminalen Ende von TccC3 in den Kokoninnenraum (Abb. 39a). Diese Domäne wird in der TIGRPFAM-Datenbank als *RHS-repeat associated core domain* (TIGR03696) bezeichnet, besteht aus circa 90 Aminosäuren und zeigt keine strukturelle Homologie zu bekannten Proteinstrukturen. Am N-Terminus startend faltet sich die Domäne in zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter gefolgt von einer 120° Drehung und einer kurzen  $\alpha$ -Helix. Das C-terminale Ende der Domäne beschreibt vier kurze antiparallele  $\beta$ -Faltblätter und eine 30 Aminosäure lange Loop-Region mit zwei kurzen  $\alpha$ -Helices, die durch eine hohe Anzahl an Tyrosinen und Aspartaten stabilisiert wird (Abb. 39c).

Im C-terminalen Bereich der Domäne sind die Seitenketten von vier Aspartaten zueinander ausgerichtet und zeigen eine ungewöhnliche Faltung (Abb. 39b). Nach der Generierung von Einzel- und Doppelmutanten durch den Austausch der vier Aspartate zu Alanin bestätigten *in vitro* und *in vivo* Experimente, die von Herrn Dr. Alexander Lang durchgeführt wurden, dass die



Domäne eine intrinsische Aspartatproteaseaktivität besitzt (Anhang, Abb. 60a und b). Asp651 und Asp674 besitzen die katalytische Aktivität, um die Peptidbindung zwischen Leu679 und der ADP-Ribosyltransferase C3 zu spalten. Die Mutationen D651A oder D674A verhindern die Abspaltung der ADP-Ribosyltransferasedomäne *in vitro* (Anhang, Abb. 60a) und hemmen die



**Abb. 39: TccC3 beherbergt eine intrinsische RHS-Aspartatproteasedomäne**

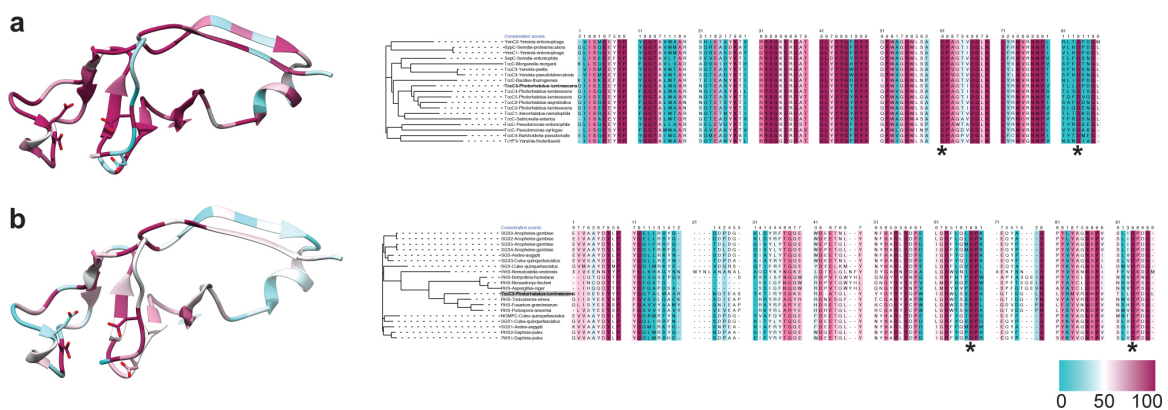
(a) TccC3 (gelb) enthält als RHS-Protein regelmäßig wiederkehrende YD-Repeats (rot), die vorwiegend an der Interaktionsfläche zu TcdB2 zu finden sind. Die RHS-Aspartatprotease-Aktivität (b) wird durch die beiden Aspartate 651 und 674 im katalytischen Zentrum bestimmt und (c,d) sie beschreibt eine neue, noch nicht bekannte Faltung von Aspartatproteasen.

Aktinfilamentquervernetzung *in vivo* (Anhang, Abb. 60b). Dadurch wird indirekt nachgewiesen, dass die ADP-Ribosyltransferase C3 sich im Kokon von TcdB2-TccC3 befinden müsste und bei einer D651A oder D674A Mutation nicht durch den TcdA1-Translokationskanal in die Wirtszelle übertragen werden könnte.

Aspartatproteasen gehören zur Gruppe der Endopeptidasen und benötigen für die Hydrolyse einer Peptidbindung zwei konservierte Aspartate sowie ein Wassermolekül, das als Nukleophil agiert und den Übergangszustand während der Spaltungsreaktion stabilisiert (James und Sielecki, 1985; Schmidt et al., 1985). Asp651 und Asp674 der Aspartatproteasedomäne von TccC3 liegen in direkter Nähe von der zu spaltenden Peptidbindung (Abb. 39b). Beide Aspartate bieten genug Raum für ein Wassermolekül, jedoch ist dieses Molekül in der

Elektronendichte von TcdB2-TccC3 nicht aufgelöst. Da die Aspartatproteasedomäne von TccC3 im Innenraum eines RHS-Proteins liegt, wird diese im weiteren Verlauf als intrinsische RHS-Aspartatproteasedomäne bezeichnet.

Die RHS-Aspartatproteasedomäne ist in RHS-Proteinen bzw. C-Komponenten von insekten-, pflanzen- und humanpathogenen Prokaryonten hoch konserviert (Abb. 40a). Die zwei katalytisch aktiven Aspartate zeigen eine durchgehende Konservierung. Diese Konservierung ist auch bei Sequenzvergleichen mit eukaryontischen RHS-Proteinen zu finden, jedoch ist die Ähnlichkeit der gesamten Domäne nicht so hoch wie die Ähnlichkeit zu prokaryontischen RHS-Proteinen (Abb. 40b). Zusätzlich ist die Konservierung der Domäne in einer geringen Anzahl an Archaeen wiederzufinden. Da aber nur wenige Archaea-Genome komplett sequenziert sind, könnte die Anzahl von homologen Domänen in Archaeen weit aus höher sein.



**Abb. 40: Konservierung von RHS-Aspartatprotease-Domänen**

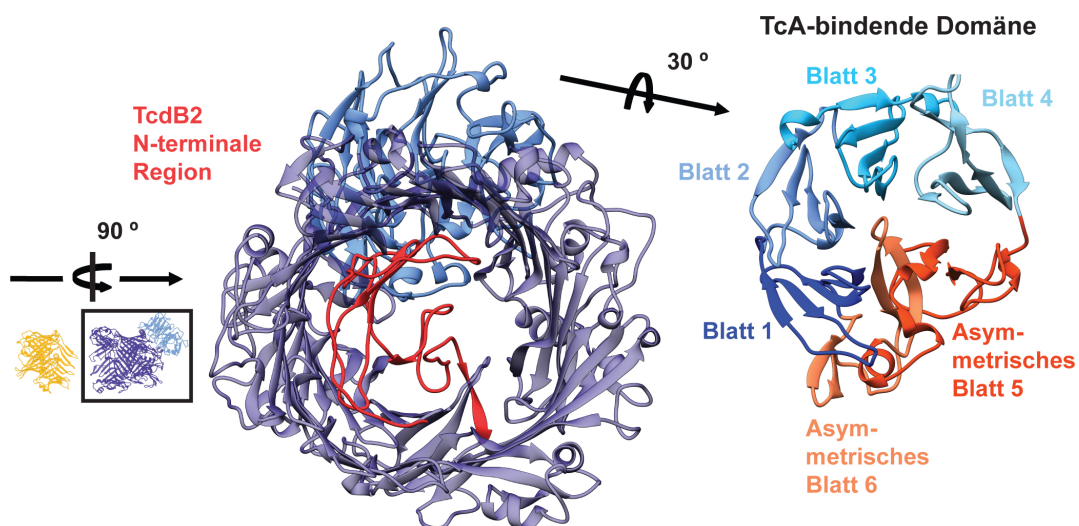
Die RHS-Aspartatprotease-Domäne in TccC3 ist sowohl in (a) Prokaryonten als auch (b) Eukaryonten wiederzufinden. Obwohl der durchschnittliche Grad der Konservierung (in 0 bis 100 %) in Prokaryonten höher als in Eukaryonten ist, sind die beiden katalytisch aktiven Aspartate und dessen umgebenden diese stabilisierenden Aminosäuren durchgehend konserviert. Die Aminosäuresequenz der RHS-Aspartatprotease-Domäne von TccC3 aus *P. luminescens* ist in grau hinterlegt.

Die Konservierung der intrinsischen RHS-Aspartatprotease-Domäne in RHS-Proteinen von Prokaryonten, Eukaryonten und Archaea beschreibt eine neue Funktion von intrinsischen Aspartatproteasen und lässt einen generellen Mechanismus in der Prozessierung von BC-Komponenten vermuten. Damit die ADP-Ribosyltransferase C3 in die Wirtszelle übertragen werden könnte, müsste TcdB2-TccC3 an TcdA1 binden. Diese Bindung erfolgt über die  $\beta$ -Propeller-Domäne im N-terminalen Bereich von TcdB2 (AS 380-692; Abb. 34, hellblau).

### 5.2.5 Die TcdB2-Struktur enthält eine unsymmetrische sechsblättrige $\beta$ -Propellerdomäne

Der N-terminale Bereich von TcdB2 kann in zwei Bereiche unterteilt werden. Der erste Bereich (AS 1-102) bildet die TcdB2-N-terminale Region (Abb. 41, rot). Diese Region liegt im Innenraum des TcdB2-TccC3-Kokons und zeigt keine Sekundärstruktur. Obwohl der N-Terminus von TcdB2 keine direkte Faltung beschreibt, schmiegt er sich über Wasserstoffbrückenbindungen sowie über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen der Innenwand des Kokons an und ragt nicht in den Kokoninnenraum hinein (Abb. 41). Aufgrund dieser Wechselwirkungen wird die TcdB2-N-terminale Region an der Innenwand stabilisiert und konnte möglicherweise nur dadurch in der kristallographischen Elektronendichte aufgelöst werden.

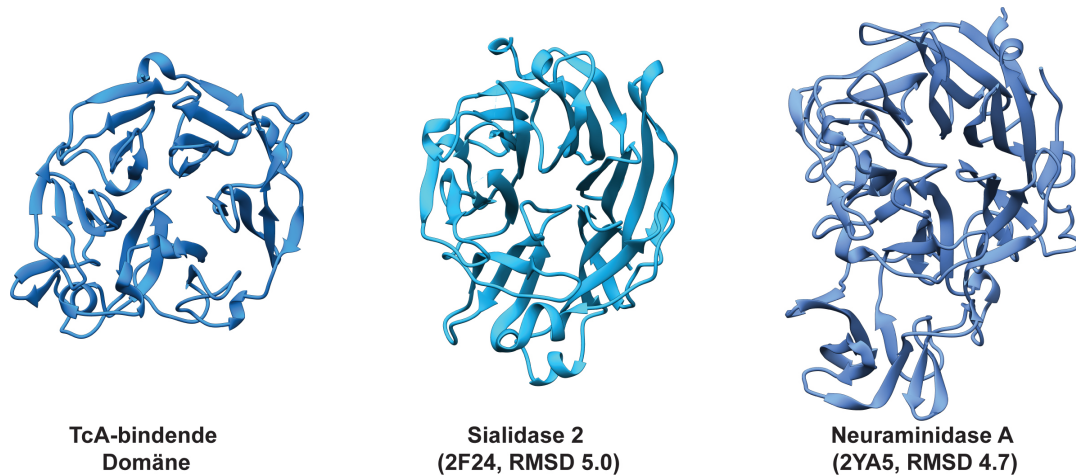
Der zweite N-terminale Bereich von TcdB2 (AS 382-690) faltet sich in eine  $\beta$ -Propellerähnliche Struktur und beschreibt eine eigene Domäne (Abb. 41, hellblau). Die elektronenmikroskopische Analyse eines TcdA1-TcdB2-TccC3-Holotoxinkomplexes bei einer Auflösung von 25 Å lässt vermuten, dass das TcdB2-TccC3-Heterodimer mit dessen TcdA1-proximalen Kokonende, in dem die  $\beta$ -Propellerdomäne sitzt, an die TcdA1-Präpore bindet (Gatsogiannis et al., 2013). Aufgrund dieser Annahme wird die  $\beta$ -Propellerdomäne im weiteren Verlauf TcA-bindende Domäne genannt (Abb. 41).



**Abb. 41: Struktur der N-terminalen Region sowie der TcA-bindenden Domäne in TcdB2**

Der N-Terminus von TcdB2 (rot) ragt nicht in den Kokoninnenraum hinein, sondern schmiegt sich als ungefaltete Domäne der Innenwand des Kokons an. Die TcA-bindende Domäne von TcdB2 (hellblau) ist ein unsymmetrischer sechsblättriger  $\beta$ -Propeller, der aus vier symmetrischen (dunkel- bis hellblau) und zwei asymmetrischen (rot und orange) Blättern besteht.

Bei einem Vergleich der TcA-bindenden Domäne mit homologen Strukturen wurden ausschließlich sechsblättrige  $\beta$ -Propellerdomänen mit höchster struktureller Homologie entdeckt. Dazu zählen die  $\beta$ -Propellerstrukturen von Sialidasen bzw. Neuraminidasen (Abb. 42). Nach genauerer Analyse der TcA-bindenden Domäne stellte sich heraus, dass es sich bei dieser Struktur um einen unsymmetrischen sechsblättrigen  $\beta$ -Propeller handelt (Abb. 41, rechtes Bild).

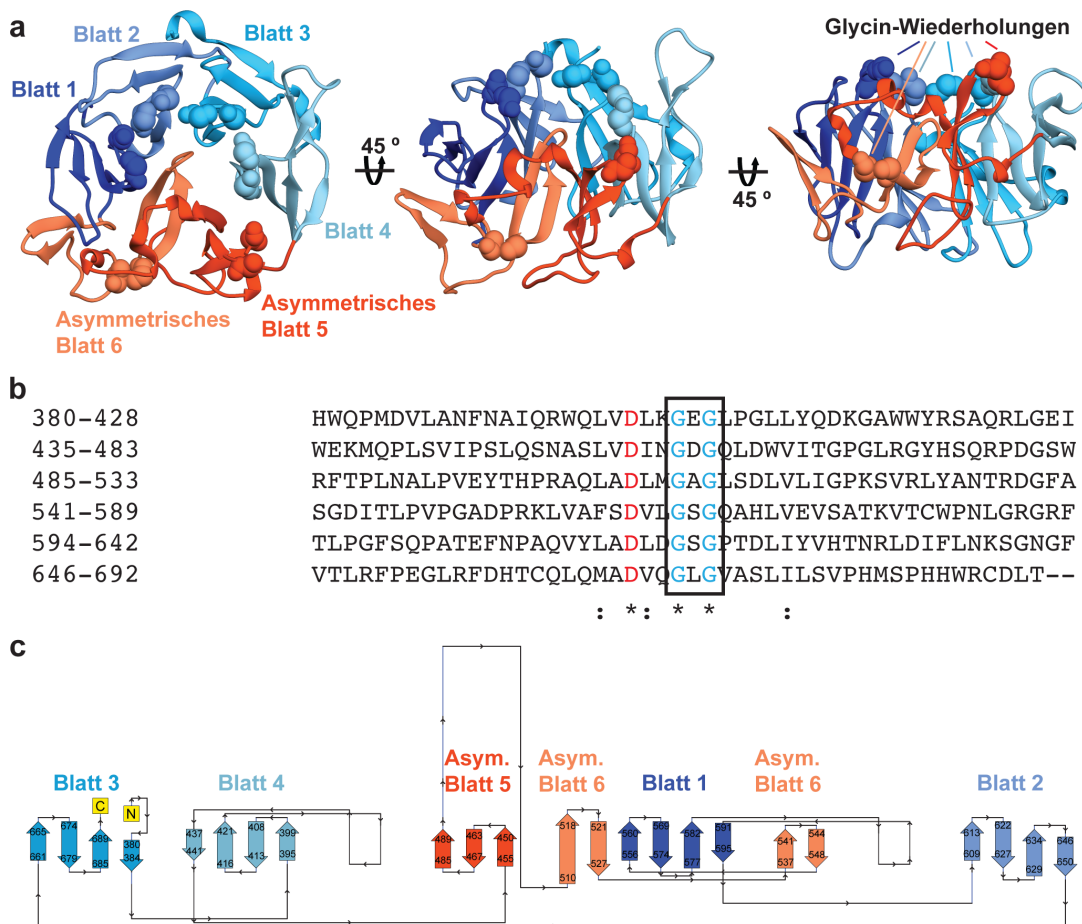


**Abb. 42: Analyse von Strukturhomologen der TcA-bindenden Domäne**

Die TcA-bindende Domäne zeigt die höchste Strukturähnlichkeit zu sechsblättrigen  $\beta$ -Propellern wie Sialidase 2 und Neuraminidase A. In Klammern sind die pdb Identifikationsnummer sowie die mittlere quadratische Standardabweichung (RMSD) angegeben.

$\beta$ -Propeller gehören nach der *structural classification of proteins* (SCOP) Datenbank in die Klasse der  $\beta$ -Faltblatt-Proteine und bestehen in ihrem Grundgerüst vorwiegend aus  $\beta$ -Faltblättern (Murzin et al., 1995). Dieses Grundgerüst zeigt eine runde scheibenförmige Struktur, die aus vierzähligen  $\beta$ -Faltblatt-Motiven aufgebaut ist. Hierbei verlaufen die  $\beta$ -Faltblätter eines Motivs antiparallel zueinander bzw. meanderförmig und jedes Motiv wird als „Blatt“ (Abb. 41, rechtes Bild) eines  $\beta$ -Propellers bezeichnet (Wall et al., 1995). Die Anzahl der Blätter eines  $\beta$ -Propellers variiert, wobei ein Propeller aus vier, sechs, sieben, acht, oder zehn Blättern aufgebaut sein kann (Chen et al., 2011). Die Blätter zeigen in ihrer Struktur eine hohe Homologie zueinander, obgleich die Aminosäuresequenz stark variiert und die jeweiligen  $\beta$ -Propellerstrukturen eine hohe Diversität in ihren Funktionen mit sich bringen. Jedoch können die Blätter aufgrund ihrer Konservierung in verschiedene Familien eingeteilt werden (Kopec und Lupas, 2013).

Die Struktur der TcA-bindenden Domäne beschreibt vier eindeutige Blätter, die jeweils aus vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehen (Abb. 41, rechtes Bild, Blatt 1 bis 4). Jedoch ist der verbleibende Teil der Struktur nicht homolog zu  $\beta$ -Propellerblättern und zeigt auch nicht die typische meanderförmige vierzählige Anordnung der  $\beta$ -Faltblätter in einem Blatt (Abb. 41, rechtes Bild, orange und rot), obwohl die gesamte Struktur eine hohe Homologie zu sechsblättrigen  $\beta$ -Propellerstrukturen hat (Abb. 42). Bei Alignierung der Aminosäuresequenz von Blatt 1 bis 4 der TcA-bindenden Domäne fällt auf, dass sie eine Konservierung von zwei



**Abb. 43: Die TcA-bindende Domäne hat die Struktur eines unsymmetrischen sechsblättrigen  $\beta$ -Propellers**

Die TcA-bindende Domäne von TcdB2 ist ein (a) unsymmetrischer sechsblättriger  $\beta$ -Propeller, der aus vier symmetrischen (dunkel- bis hellblau) und zwei asymmetrischen (rot und orange) Blättern besteht. Jedes symmetrische Blatt besteht aus vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die keine Strukturhomologie zu den deformierten Blättern zeigen. Jedoch sind bei (b) Alignierung aller sechs Blätter zwei konservierte Glycine (schwarzer Rahmen und Kugelmoleküldarstellung in (a) und ein konserviertes Aspartat (mit Sternen hervorgehoben) zu erkennen, die das Indiz für einen sechsblättrigen  $\beta$ -Propeller sind. Ein Topologiemodell (c) des  $\beta$ -Propellers zeigt zur Übersicht alle sechs Blätter in ihren Farben eingefärbt.

---

Aspartat und zwei Glycinen in einer kurzen Loop-Region zwischen dem ersten und zweiten  $\beta$ -Faltblatt aufweisen (Abb. 43a und b). Diese Loop-Regionen des  $\beta$ -Propellers sind in der TcdB2-TccC3-Gesamtstruktur in Richtung des Kokons gerichtet. Zusätzlich sind bei Vergleich der Sequenz des verbleibenden Teils der Struktur mit den Sequenzen des Blattes 1 bis 4 auch das Aspartat und die beiden Glycine wiederzufinden (Abb. 43b).

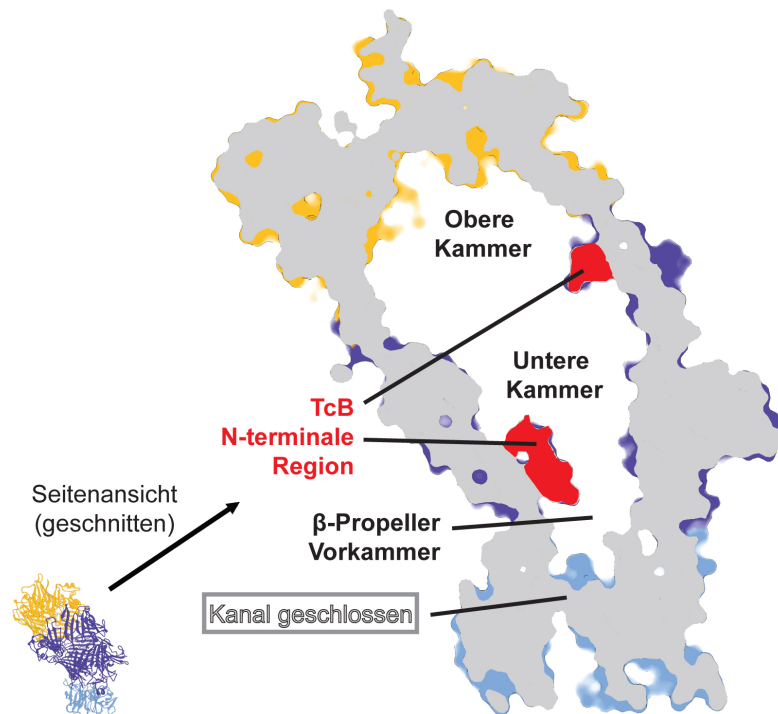
Da der verbleibende Teil der TcA-bindenden Domäne keine symmetrischen  $\beta$ -Propellerblätter ausbildet, aber trotzdem zwei konservierte Bereiche auf Basis der Sequenz bestätigt, wird dieser Teil im weiteren Verlauf als asymmetrisches Blatt 5 und 6 bezeichnet (Abb. 41 und 43a und c). Somit beschreibt die TcA-bindende Domäne einen unsymmetrischen sechsblättrigen  $\beta$ -Propeller.

Bei Vergleich der konservierten Bereiche der TcA-bindenden Domäne mit bekannten  $\beta$ -Propellerstrukturen ist zu erkennen, dass diese in der Konsensussequenz der Integrin-ähnlichen  $\beta$ -Propellerfamilie wiederzufinden sind (Xiong et al., 2002). Diese Konsensussequenz besteht aus neun Aminosäuren, die nach Vergleich mit denen der  $\beta$ -Propellerblätter der TcA-bindenden Domäne als dxxGxGxxd-Motiv bezeichnet wird (Chouhan et al., 2011). Hierbei sind die beiden Glycine hoch und die beiden Aspartate leicht konserviert. Die dazwischen liegenden Reste beschreiben vorwiegend hydrophobe Aminosäuren.

Die höchste strukturelle Homologie zur TcA-bindenden Domäne findet sich in der Lektinstruktur der Pilzart *Psathyrella velutina* wieder (Cioci et al., 2006). Dieses Lektin besteht aus einem pseudosymmetrischen siebenblättrigen  $\beta$ -Propeller und enthält sieben dxxGxGxxd-Motive, das heißt ein Motiv pro  $\beta$ -Propellerblatt (Anhang, Abb. 61a). Bei Vergleich der Lektinstruktur mit der Struktur aus TcdB2 ist zu erkennen, dass ein dxxGxGxxd-Motiv des Lektins mit einem Motiv eines symmetrischen Blattes des TcdB2- $\beta$ -Propellers aligniert (Anhang, Abb. 61a, b und d). Die weiteren sechs Motive des Lektins sitzen in Bereichen der Struktur, in denen das Motiv eines unsymmetrischen Blattes des TcdB2- $\beta$ -Propellers auftritt. Zusätzlich wurde eine hohe Konservierung des dxxGxGxxd-Motives bei Aminosäuresequenzvergleichen mit B-Komponenten und RHS-Proteinen anderer Prokaryonten, bei denen dieses Motiv durchgehend sechsmal wiederzufinden ist, nachgewiesen (Anhang, Abb. 62). Diese Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass es sich bei der TcA-bindenden Domäne um einen sechsblättrigen, aber unsymmetrischen  $\beta$ -Propeller handelt.

**5.2.6 Die Asymmetrie des sechsblättrigen  $\beta$ -Propellers verschließt die TcA-bindende Domäne in der TcdB2-TccC3-Kristallstruktur und dadurch den Ausgang in den TcdA1-Translokationskanal**

Wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben ragen hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren und Tyrosine in den Innenraum des TcdB2-TccC3-Kokons, die möglicherweise die Entfaltung der ADP-Ribosyltransferase C3 regulieren (Abb. 36 und 37). Bei genauerer Betrachtung lässt sich der Innenraum des Kokons in drei Bereiche einteilen. Die obere bzw. untere Kammer geht aus dem Kokoninnenraum von TccC3 bzw. TcdB2 hervor, wobei beide Kammern einseitig durch die TcB N-terminale Region voneinander getrennt werden (Abb. 44). Der dritte Bereich wird als  $\beta$ -



**Abb. 44: Der  $\beta$ -Propeller in der TcdB2-Struktur hält den TcdB2-TccC3-Kokon verschlossen**

Eine Seitenansicht (links unten) zeigt zentriert geschnitten (rechts) die Oberfläche von TccC3 (gelb), TcdB2 (dunkelblau) sowie die des verschlossenen  $\beta$ -Propellers (hellblau). Dabei lässt sich der Kokoninnenraum von TcdB2-TccC3 in eine obere, untere und eine  $\beta$ -Propellervorkammer unterteilen. Hervorzuheben ist, dass die N-terminale Region von TcdB2 (rot) nicht in den Kokoninnenraum hineinragt, sondern sich an dessen Innenwand anschmiegt.

Propellervorkammer bezeichnet, die sich ebenfalls durch die N-terminale Region von TcdB2 einseitig von der unteren Kammer abgrenzt und vom Innenraum des  $\beta$ -Propellers gebildet wird (Abb. 44). Diese Seite des TcdB2-TccC3-Kokons wird durch die  $\beta$ -Propellerdomäne

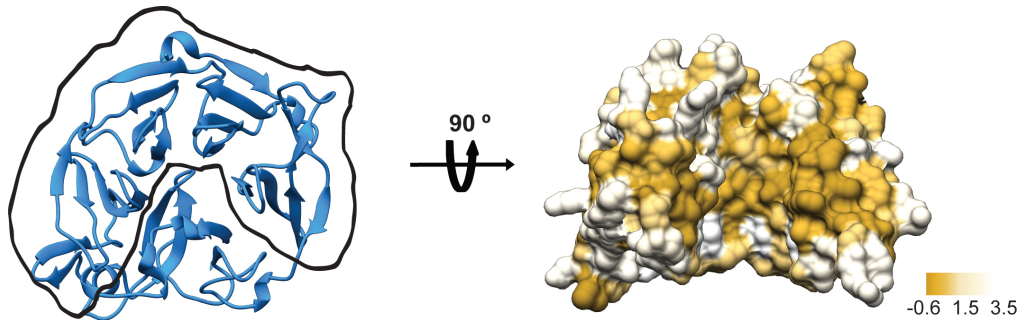
verschlossen. Genauer gesagt verschließen zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, die ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut sind, das Zentrum des  $\beta$ -Propellers und grenzen dadurch den Kokoninnenraum von der Umgebung ab (Abb. 41 und 44). Jedoch weist das gesamte TcdB2-TccC3-Heterodimer enge Kanäle auf, die den Kokon für Lösemittel durchlässig machen.

Eine große Anzahl an symmetrischen und pseudosymmetrischen  $\beta$ -Propellerstrukturen zeigt in deren Zentrum bzw. auf deren Symmetrieachse einen offenen Kanal, durch den Liganden bzw. Untereinheiten in den  $\beta$ -Propeller hineinragen und mit ihm interagieren können (Chen et al., 2011). Dabei führt die Interaktion mit Liganden bzw. Bindungspartnern zu einer Änderung in der oligomeren Struktur des Komplexes, aber nur sehr selten zu einer Strukturänderung des  $\beta$ -Propellers. Vielmehr wird ein  $\beta$ -Propeller durch die Interaktion mit Liganden noch stärker stabilisiert und sichert dadurch die weiteren Funktionen des gesamten Komplexes bei z.B. die Ausbildung von Zell-Zellkontakten oder die Weiterleitung von Signalen (Chouhan et al., 2011).

Der  $\beta$ -Propeller von TcdB2 ist unsymmetrisch aufgebaut und verschließt den Kokon in der TcA-bindenden Region. Damit die ADP-Ribosyltransferase C3 durch den TcdA1-Translokationskanal in die Wirtszelle übertragen werden könnte, müsste der  $\beta$ -Propeller seine Struktur bei Bindung an die TcB-bindende Domäne der TcdA1-Präpore ändern bzw. den Kanal in die TcdA1-Präpore öffnen. Diese Öffnung wird durch die kryoelektronenmikroskopische Struktur des TcdA1-TcdB2-TccC3-Holotoxins, das einen geöffneten Translokationskanal zeigt, bei einer Auflösung von 9,1 Å bestätigt (Meusch et al., 2014).

Die ADP-Ribosyltransferase C3 wird mit Hilfe des TcdA1-Translokationskanals wahrscheinlich in einem entfalteten Zustand in die Wirtszelle übertragen. Neben einer Entfaltungshelfer-ähnlichen Funktion des TcdB2-TccC3-Kokons zeigt eine Hydrophobizitätsanalyse des  $\beta$ -Propellerinnenraums auch vorwiegend hydrophobe Aminosäuren (Abb. 45). Da sowohl der Kokon- und  $\beta$ -Propellerinnenraum als auch der Innenraum der TcB-bindenden Domäne sowie der obere Bereich des TcdA1-Translokationskanals ein hydrophobes Milieu aufweisen, bilden sie möglicherweise im Holotoxin einen zusammenhängenden Entfaltungsraum aus und bekräftigen die Hypothese, dass die ADP-Ribosyltransferase C3 in einer entfalteten Form in die Wirtszelle übertragen wird.





**Abb. 45: Hydrophobizitätsanalyse des  $\beta$ -Propellerinnenraums in der TcA-bindenden Domäne**

Für die Hydrophobizitätsanalyse werden die symmetrischen Blätter (schwarze Umrandung) des  $\beta$ -Propellers verwendet und nach Hessa et al. 2005 (-0,6 = hydrophob bis 3,5 = hydrophil) als strukturierte Oberfläche dargestellt.

Im Verlauf dieser Doktorarbeit publizierten Busby et al. die TcdB2-TccC3 homologe Struktur von YenB-YenC2 aus *Yersinia entomophaga* (Busby et al., 2013). Diese Struktur zeigt bei Alignierung mit der TcdB2-TccC3-Struktur eine mittlere quadratische Standardabweichung (RMSD) von 0,77 Å, wodurch eine hohe strukturelle Homologie beider Strukturen zueinander bestätigt wird (Anhang, Abb. 63). Diese hohe strukturelle Homologie wird durch identische Domänenfaltungen in der Kokonstruktur, der TcdB2 N-terminalen Region sowie der intrinsischen RHS-Aspartat-proteasedomäne im C-Terminus von TccC3 untermauert (Anhang, Abb. 64 und 65) und würde die Theorie eines generellen Mechanismus der Biogenese von BC-Komponenten bestärken.

Die TcA-bindende Domäne von YenB beschreibt nach Busby et al. einen fünfblättrigen  $\beta$ -Propeller, der symmetrieabhängig an das YenA2-Pentamer bindet und einen Holotoxinkomplex formt (Busby et al., 2013). Bei Vergleich der TcA-bindenden Domänen von TcdB2 und YenB zeigen sie eine identische Faltung und sechs identische dxxGxGxxd-Motive, wodurch auch ein unsymmetrischer sechsblättriger  $\beta$ -Propeller in YenB wahrscheinlich ist (Anhang, Abb. 61b bis 61d).

Möglicherweise wird eine Asymmetrie in die  $\beta$ -Propellerstruktur von B-Komponenten induziert, um eine Bindung an die fünffach-symmetrische A-Komponente und damit die Bildung eines Tc-Holotoxinkomplexes zu ermöglichen. Eine künstlich induzierte Pseudofünffach-Symmetrie würde eine gewisse Flexibilität in der Struktur der TcA-bindenden Domänen voraussetzen. Diese Hypothese wird durch den Nachweis von sehr hohen B-Faktoren in der TcA-bindenden

Domäne von TcdB2, die eine Flexibilität in diesen Bereichen vermuten lassen, bestärkt (Anhang, Abb. 66). Eine künstlich induzierte Pseudofünffach-Symmetrie in der TcA-bindenden Domäne von TcdB2 wird durch die kryoelektronenmikroskopische Struktur eines TcdA1-TcdB1-TccC3-Holotoxinkomplexes bekräftigt (Meusch et al., 2014).

### **Zusammenfassung: Das TcdB2-TccC3-Heterodimer**

Das TcdB2-TccC3-Heterodimer zeigt ein nicht klassisches RHS-Protein, das aus einem unsymmetrischen sechsblättrigen  $\beta$ -Propeller in TcdB2 und einem kokonähnlichen Entfaltungsraum, der zu gleichen Teilen aus TcdB2 und TccC3 besteht, aufgebaut ist. Dieser Entfaltungsraum beherbergt die ADP-Ribosyltransferase C3, die im C-terminalen Bereich von TccC3 durch die autoproteolytische Aktivität einer intrinsischen RHS-Aspartatproteasedomäne abgespalten wird, in einer möglicherweise ungefalteten Form. Der  $\beta$ -Propeller in TcdB2 beschreibt die TcA-bindende Domäne, mit der TcdB2-TccC3 an die TcB-bindende Domäne der TcdA1-Präpore bindet. Hierbei interagieren TcA- und TcB-bindende Domäne möglicherweise über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, um einen stabilen Holotoxinkomplex zu bilden. Zusätzlich könnte diese Komplexbildung über eine künstlich induzierte Symmetrisierung des  $\beta$ -Propellers ermöglicht werden, wodurch die Interaktion von TcA- und TcB-bindender Domäne nach einem „Schlüssel-Schloss“-Prinzip funktionieren könnte.

## **5.3 Modell des Translokationsmechanismus von Tc-Toxinen**

Die röntgenkristallographischen Modelle der TcdA1-Präpore und des TcdB2-TccC3-Heterodimers führen zu einer detaillierteren Betrachtung und einem genaueren Verständnis des möglichen Translokationsmechanismus von Tc-Toxinen. Während der Analyse der kristallographischen Strukturen ermittelte Dr. Christos Gatsogiannis die kryoelektronenmikroskopischen Strukturen der TcdA1-Pore bzw. des TcdA1-TcdB2-TccC3-Holotoxins bei einer Auflösung von jeweils 9 Å (Meusch et al., 2014). Die kryoelektronenmikroskopische Holotoxinstruktur zeigt einen eindeutig geöffneten Translokationskanal im Bereich des  $\beta$ -Propellers von TcdB2-TccC3 und der TcB-bindenden Domäne der TcdA1-Pore. Desweiteren ist in der Holotoxinstruktur im Translokationskanal der TcdA1-Pore zusätzliche Elektronendichte zu erkennen, die auf die Elektronendichte der ADP-Ribosyltransferase C3 hindeutet. Die kryoelektronenmikroskopische Struktur der TcdA1-Pore beschreibt eine massive Umorientierung der rezeptorbindenden und neuraminidaseähnlichen Domänen in der äußeren

Hülle, was auf eine Flexibilität der TcdA1-Pore während der Interaktion mit potentiellen Wirtszellrezeptoren hindeuten könnte. Durch die Strukturanalyse der röntgenkristallographischen und der kroelektronenmikroskopischen Strukturen sowie der Interaktionen in den untersuchten Komplexen kann der gesamte Mechanismus der Translokation in vier Abläufe eingeteilt werden: Holotoxinkomplexbildung, Rezeptorbindung, Membranpenetration bzw. Porenbildung sowie Übertragung der toxischen Komponente.

Ein TcdA1-Pentamer und ein TcdB2-TccC3-Heterodimer assemblieren zu einem Komplex. Die autoproteolytisch prozessierte und ungefaltete ADP-Ribosyltransferase sitzt in einem geschlossenen Entfaltungsraum, der von dem TcdB2-TccC3-Heterodimer gebildet wird (Abb. 46a). Die Assemblierung des Holotoxins führt möglicherweise zu einer künstlich induzierten Symmetrisierung der TcA-bindenden Domäne in TcdB2, woraufhin sich der  $\beta$ -Propeller öffnet und die ADP-Ribosyltransferase in den TcdA1-Translokationskanal eindringt (Abb. 46b). Die Übertragung in den Kanal könnte spontan ablaufen. Desweiteren verengt sich der Translokationskanal in der TcdA1-Präpore im unteren Bereich bis auf 3,9 Å, da fünf Tyrosine (Tyr2356) in den Kanal hineinragen und ihn dadurch verschließen (Abb. 27).

Nach Bildung des Komplexes bindet TcdA1 über dessen rezeptorbindenden Domänen an Rezeptoren der Wirtszelloberfläche (Abb. 46c). Eine spezifische Bindung von TcdA1 an die Rezeptoren induziert wahrscheinlich die Aufnahme des Holotoxins in die Wirtszelle mittels rezeptorvermittelter Endozytose (Abb. 46d). Die unterschiedliche Anzahl an rezeptorbindenden Domänen in der äußeren Hülle von A-Komponenten bei verschiedenen Prokaryonten lassen eine Spezifität für bestimmte Rezeptoren vermuten (Anhang, Tab. 9 und 10). Ein alternativer Mechanismus wäre die direkte Penetration der Wirtszellmembran (Abb. 46, rechts startend).

Da eine Konformationsänderung zur TcdA1-Pore aufgrund des „elektrostatischen Schlosses“ nur bei pH-Werten unterhalb von 4 und oberhalb von 11 erfolgt (Abb. 32b), ist zum einen die Ansäuerung von Endosomen im endolysosomalen Weg eine Möglichkeit für die Porenbildung (Abb. 46e) durch TcdA1 (Jensen und Bainton, 1973). Zum anderen zeigen *P. luminescens* Tc-Toxine auch orale Toxizität auf Insektenlarven (Bowen et al., 1998). Insekten weisen in ihrem Intestinaltrakt pH-Werte von 11 oder höher auf (Dow, 1984). Dadurch könnte das Holotoxin auch die apikale Seite der Darmwand penetrieren (Abb. 46e) und die ADP-Ribosyltransferase C3 bzw. C5 in die Wirtszelle übertragen (Abb. 46f).

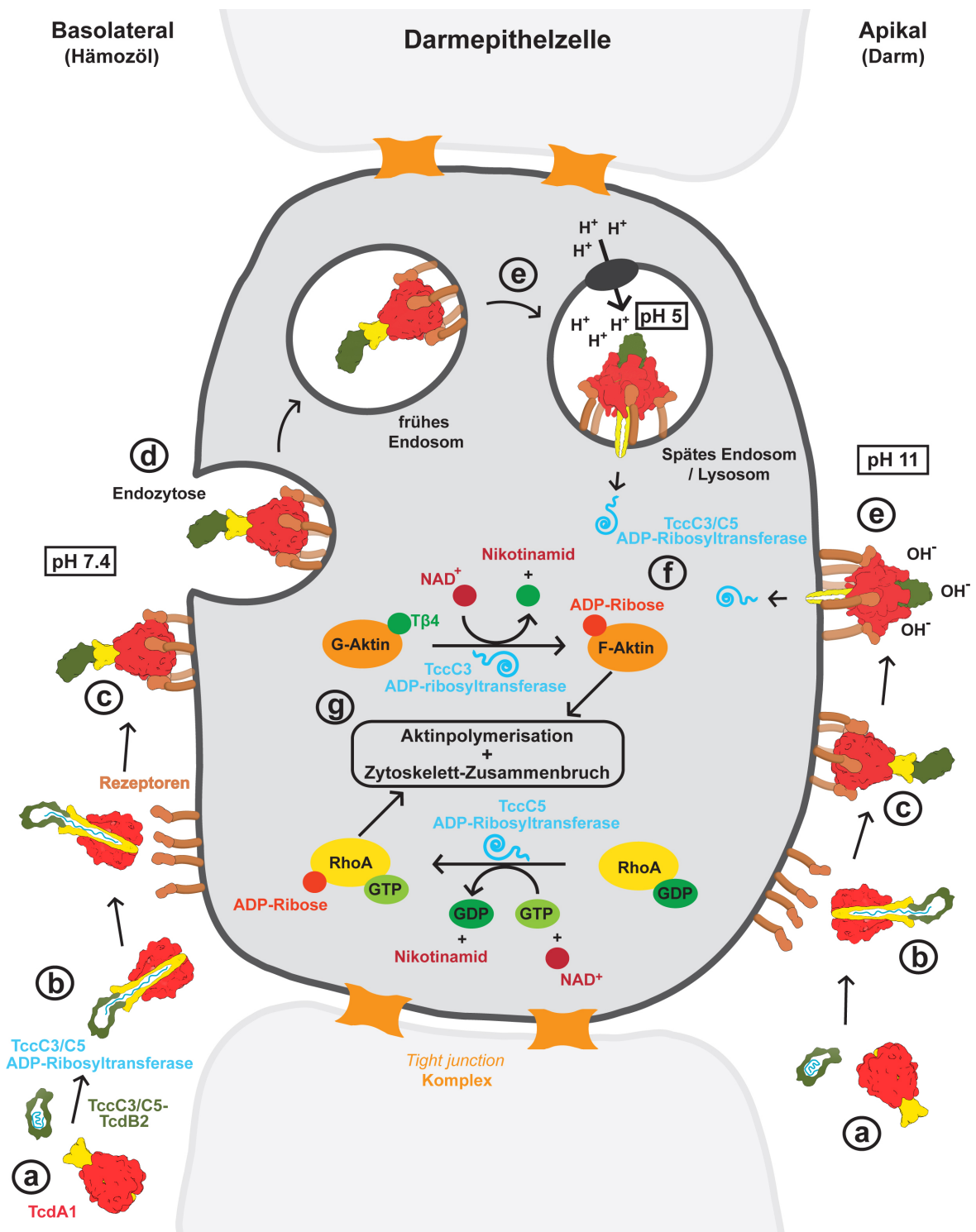


Abb. 46: Möglicher dualer Mechanismus der Komplexbildung, der Rezeptorbindung und der Porenbildung bei Tc-Toxinen von *Photobacterium luminescens* während der Infektion von Darmepithelzellen

Die Translokation der toxischen Komponente bei Tc-Toxinen kann direkt (rechts startend) nach Penetration der Wirtszellmembran im basischem Milieu und indirekt (links startend) nach Rezeptorvermittelter Endozytose und Penetration der Endosomenmembran im sauren Milieu erfolgen. Detaillierte Erläuterungen werden in Abschnitt 6.5 beschrieben.

---

Aufgrund der Konservierung von A-, B- und C-Komponenten in insekten-, pflanzen- und humanpathogenen Prokaryonten ist ein genereller Mechanismus der Translokation bei Tc-Toxinen sehr wahrscheinlich. Nur die C-terminalen Bereiche der C-Komponenten sind innerhalb dieser Gruppe an Prokaryonten nicht konserviert und werden deshalb auch als *hypervariable regions* bezeichnet. Eine strukturbasierte Vorhersage führte zu dem Ergebnis, dass alle analysierten *hypervariable regions* eine enzymatische Aktivität aufweisen, d.h. dass sie Enzyme beschreiben, die Zielproteine modifizieren (Anhang, Tab. 17). Im Falle der ADP-Ribosyltransferase C3 bzw. C5 werden Zielproteine ADP-ribosyliert, die dann aufgrund einer veränderten Funktion zum Zusammenbruch des Zytoskeletts und zum Zelltod führen (Abb. 46g). Man kann davon ausgehen, dass tausende dieser hochaktiven Enzyme bei einer Infektion in den Wirtsorganismus sekretiert werden und damit hoch effiziente tödliche Waffen beschreiben. Diese Waffen nutzen Prokaryonten, um aufgrund des Selektionsdrucks ihre eigene Fortpflanzung zu gewährleisten und den Wirt zu töten.



---

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., *et al.* (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *66*, 213-221.

Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H., and Adams, P.D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *68*, 352-367.

Agniswamy, J., Joyce, M.G., Hammer, C.H., and Sun, P.D. (2008). Towards a rational approach for heavy-atom derivative screening in protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *64*, 354-367.

Ahantarig, A., Chantawat, N., Waterfield, N.R., French-Constant, R., and Kittayapong, P. (2009). PirAB toxin from *Photobacterium damela* as a larvicide against dengue vectors. *Appl Environ Microbiol* *75*, 4627-4629.

Aktories, K., Lang, A.E., Schwan, C., and Mannherz, H.G. (2011). Actin as target for modification by bacterial protein toxins. *FEBS J* *278*, 4526-4543.

Aktories, K., Schwan, C., Papatheodorou, P., and Lang, A.E. (2012). Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. Bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. *Toxicon* *60*, 572-581.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* *215*, 403-410.

Anandakrishnan, R., Aguilar, B., and Onufriev, A.V. (2012). H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Res* *40*, W537-541.

Andreeva, A., Howorth, D., Chandonia, J.M., Brenner, S.E., Hubbard, T.J., Chothia, C., and Murzin, A.G. (2008). Data growth and its impact on the SCOP database: new developments. *Nucleic Acids Res* *36*, D419-425.

Andrews, P. (1966). Molecular-sieve chromatography. *Br Med Bull* *22*, 109-114.

Arnold, E., and Rossmann, M.G. (1986). Effect of errors, redundancy, and solvent content in the molecular replacement procedure for the structure determination of biological macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 5489-5493.

Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T., and Ben-Tal, N. (2010). ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* *38*, W529-533.

Baker, D., Bystroff, C., Fletterick, R.J., and Agard, D.A. (1993). PRISM: topologically constrained phased refinement for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *49*, 429-439.

Barth, H., and Aktories, K. (2011). New insights into the mode of action of the actin ADP-ribosylating virulence factors *Salmonella enterica* SpvB and *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Eur J Cell Biol* *90*, 944-950.

Bashford, D., and Karplus, M. (1990). pKa's of ionizable groups in proteins: atomic detail from a continuum electrostatic model. *Biochemistry* *29*, 10219-10225.

- Bedding, R.A., and Molyneux, A.S. (1982). Penetration of the insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. *Nematologica* *28*, 354-359.
- Begun, J., McLeish, M.J., Caine, J.M., Palant, E., Grunewald, G.L., and Martin, J.L. (2002). Crystallization of PNMT, the adrenaline-synthesizing enzyme, is critically dependent on a high protein concentration. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *58*, 314-315.
- Beutler, B., and Rietschel, E.T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* *3*, 169-176.
- Bjorklund, A.K., Ekman, D., and Elofsson, A. (2006). Expansion of protein domain repeats. *PLoS Comput Biol* *2*, e114.
- Blackburn, M., Golubeva, E., Bowen, D., and Ffrench-Constant, R.H. (1998). A novel insecticidal toxin from *photorhabdus luminescens*, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *manduca sexta*. *Appl Environ Microbiol* *64*, 3036-3041.
- Blackburn, M.B., Martin, P.A., Kuhar, D., Farrar, R.R., Jr., and Gundersen-Rindal, D.E. (2011). The occurrence of *photorhabdus*-like toxin complexes in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One* *6*, e18122.
- Blaustein, R.O., Koehler, T.M., Collier, R.J., and Finkelstein, A. (1989). Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 2209-2213.
- Boggon, T.J., and Shapiro, L. (2000). Screening for phasing atoms in protein crystallography. *Structure* *8*, R143-149.
- Booth, D.S., Avila-Sakar, A., and Cheng, Y. (2011). Visualizing proteins and macromolecular complexes by negative stain EM: from grid preparation to image acquisition. *J Vis Exp*.
- Bowen, D., Rocheleau, T.A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R., and ffrench-Constant, R.H. (1998). Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* *280*, 2129-2132.
- Bowen, D.J., and Ensign, J.C. (1998). Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *photorhabdus luminescens*. *Appl Environ Microbiol* *64*, 3029-3035.
- Brooks, B.R., Brooks, C.L., 3rd, Mackerell, A.D., Jr., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., *et al.* (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* *30*, 1545-1614.
- Brugirard-Ricaud, K., Duchaud, E., Givaudan, A., Girard, P.A., Kunst, F., Boemare, N., Brehelin, M., and Zumbihl, R. (2005). Site-specific antiphagocytic function of the *Photorhabdus luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cell Microbiol* *7*, 363-371.
- Brugirard-Ricaud, K., Givaudan, A., Parkhill, J., Boemare, N., Kunst, F., Zumbihl, R., and Duchaud, E. (2004). Variation in the effectors of the type III secretion system among *Photorhabdus* species as revealed by genomic analysis. *J Bacteriol* *186*, 4376-4381.
- Busby, J.N., Panjikar, S., Landsberg, M.J., Hurst, M.R., and Lott, J.S. (2013). The BC component of ABC toxins is an RHS-repeat-containing protein encapsulation device. *Nature* *501*, 547-550.
- Cabral, C.M., Cherqui, A., Pereira, A., and Simoes, N. (2004). Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az29. *Appl Environ Microbiol* *70*, 3831-3838.



- Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N.B., and Bhatnagar, R. (2004). Bacterial insecticidal toxins. *Crit Rev Microbiol* *30*, 33-54.
- Chen, C.K., Chan, N.L., and Wang, A.H. (2011). The many blades of the beta-propeller proteins: conserved but versatile. *Trends Biochem Sci* *36*, 553-561.
- Chouhan, B., Denesyuk, A., Heino, J., Johnson, M.S., and Denessiouk, K. (2011). Conservation of the human integrin-type beta-propeller domain in bacteria. *PLoS One* *6*, e25069.
- Ciche, T.A., and Ensign, J.C. (2003). For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Appl Environ Microbiol* *69*, 1890-1897.
- Cioci, G., Mitchell, E.P., Chazalet, V., Debray, H., Oscarson, S., Lahmann, M., Gautier, C., Breton, C., Perez, S., and Imberty, A. (2006). Beta-propeller crystal structure of *Psathyrella velutina* lectin: an integrin-like fungal protein interacting with monosaccharides and calcium. *J Mol Biol* *357*, 1575-1591.
- Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *50*, 760-763.
- Commoner, B., and Lipkin, D. (1949). The Application of the Beer-Lambert Law to Optically Anisotropic Systems. *Science* *110*, 41-43.
- Cowan, K. (2006). The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *62*, 1002-1011.
- Daborn, P.J., Waterfield, N., Silva, C.P., Au, C.P., Sharma, S., and French-Constant, R.H. (2002). A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 10742-10747.
- Davis, I.W., Leaver-Fay, A., Chen, V.B., Block, J.N., Kapral, G.J., Wang, X., Murray, L.W., Arendall, W.B., 3rd, Snoeyink, J., Richardson, J.S., *et al.* (2007). MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* *35*, W375-383.
- Dessau, M.A., and Modis, Y. (2011). Protein crystallization for X-ray crystallography. *J Vis Exp*.
- Dickinson, L., Russell, V., and Dunn, P.E. (1988). A family of bacteria-regulated, cecropin D-like peptides from *Manduca sexta*. *J Biol Chem* *263*, 19424-19429.
- Dow, J.A. (1984). Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am J Physiol* *246*, R633-636.
- Dowling, A.J., Daborn, P.J., Waterfield, N.R., Wang, P., Streuli, C.H., and French-Constant, R.H. (2004). The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy (Mcf) promotes apoptosis in mammalian cells. *Cell Microbiol* *6*, 345-353.
- Dowling, A.J., Waterfield, N.R., Hares, M.C., Le Goff, G., Streuli, C.H., and French-Constant, R.H. (2007). The Mcf1 toxin induces apoptosis via the mitochondrial pathway and apoptosis is attenuated by mutation of the BH3-like domain. *Cell Microbiol* *9*, 2470-2484.
- Doyle, S.M., Hoskins, J.R., and Wickner, S. (2012). DnaK chaperone-dependent disaggregation by caseinolytic peptidase B (ClpB) mutants reveals functional overlap in the N-terminal domain and nucleotide-binding domain-1 pore tyrosine. *J Biol Chem* *287*, 28470-28479.
- Drenth, J., and Mesters, J. (2007). Principles of protein x-ray crystallography, 3rd edn (New York: Springer).
- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J.F., *et al.* (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat Biotechnol* *21*, 1307-1313.
- Dunphy, G.B. (1994). Interaction of mutants of *Xenorhabdus nematophilus*

- (Enterobacteriaceae) with antibacterial systems of *Galleria mellonella* larvae (Insecta: Pyralidae). *Can J Microbiol* *40*, 161-168.
- Eleftherianos, I., Boundy, S., Joyce, S.A., Aslam, S., Marshall, J.W., Cox, R.J., Simpson, T.J., Clarke, D.J., ffrench-Constant, R.H., and Reynolds, S.E. (2007). An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 2419-2424.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *66*, 486-501.
- Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *62*, 72-82.
- Feld, G.K., Brown, M.J., and Krantz, B.A. (2012). Ratcheting up protein translocation with anthrax toxin. *Protein Sci* *21*, 606-624.
- Felfoldi, G., Marokhazi, J., Kepiro, M., and Venekei, I. (2009). Identification of natural target proteins indicates functions of a serralyisin-type metalloprotease, PrtA, in anti-immune mechanisms. *Appl Environ Microbiol* *75*, 3120-3126.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* *246*, 64-71.
- Feulner, G., Gray, J.A., Kirschman, J.A., Lehner, A.F., Sadosky, A.B., Vlazny, D.A., Zhang, J., Zhao, S., and Hill, C.W. (1990). Structure of the *rhsA* locus from *Escherichia coli* K-12 and comparison of *rhsA* with other members of the *rhs* multigene family. *J Bacteriol* *172*, 446-456.
- ffrench-Constant, R., and Bowen, D. (1999). Photorhabdus toxins: novel biological insecticides. *Curr Opin Microbiol* *2*, 284-288.
- Ffrench-Constant, R., and Waterfield, N. (2005). An ABC Guide to the Bacterial Toxin Complexes. *Adv Appl Microbiol* *58C*, 169-183.
- ffrench-Constant, R., Waterfield, N., Daborn, P., Joyce, S., Bennett, H., Au, C., Dowling, A., Boundy, S., Reynolds, S., and Clarke, D. (2003). Photorhabdus: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. *FEMS Microbiol Rev* *26*, 433-456.
- ffrench-Constant, R.H., Dowling, A., and Waterfield, N.R. (2007). Insecticidal toxins from Photorhabdus bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon* *49*, 436-451.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., and Stackebrandt, E. (1997). Xenorhabdus and Photorhabdus spp.: bugs that kill bugs. *Annu Rev Microbiol* *51*, 47-72.
- Garman, E., and Owen, R.L. (2007). Cryocrystallography of macromolecules: practice and optimization. *Methods Mol Biol* *364*, 1-18.
- Gatsogiannis, C., Lang, A.E., Meusch, D., Pfaumann, V., Hofnagel, O., Benz, R., Aktories, K., and Raunser, S. (2013). A syringe-like injection mechanism in Photorhabdus luminescens toxins. *Nature* *495*, 520-523.
- Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* *182*, 319-326.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., and Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol* *42*, 611-643.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13732-13737.
- Goodrich-Blair, H., and Clarke, D.J. (2007). Mutualism and pathogenesis in Xenorhabdus and

- Photorhabdus: two roads to the same destination. *Mol Microbiol* 64, 260-268.
- Hallett, E.A., Dillman, A.R., Hong, A.V., Zhang, Y., Yano, J.M., DeMarco, S.F., and Sternberg, P.W. (2011). A sensory code for host seeking in parasitic nematodes. *Curr Biol* 21, 377-383.
- Hares, M.C., Hinchliffe, S.J., Strong, P.C., Eleftherianos, I., Dowling, A.J., French-Constant, R.H., and Waterfield, N. (2008). The *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* toxin complex is active against cultured mammalian cells. *Microbiology* 154, 3503-3517.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16, 574-581.
- Held, K.G., LaRock, C.N., D'Argenio, D.A., Berg, C.A., and Collins, C.M. (2007). A metalloprotease secreted by the insect pathogen *Photorhabdus luminescens* induces melanization. *Appl Environ Microbiol* 73, 7622-7628.
- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S.H., and von Heijne, G. (2005). Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* 433, 377-381.
- Heymann, J.B., Bartho, J.D., Rybakova, D., Venugopal, H.P., Winkler, D.C., Sen, A., Hurst, M.R., and Mitra, A.K. (2013). Three-dimensional structure of the toxin-delivery particle antifeeding prophage of *Serratia entomophila*. *J Biol Chem* 288, 25276-25284.
- Hill, C.W., Sandt, C.H., and Vlazny, D.A. (1994). Rhs elements of *Escherichia coli*: a family of genetic composites each encoding a large mosaic protein. *Mol Microbiol* 12, 865-871.
- Hinchliffe, S., Hares, M.C., Dowling, A.J., and French-Constant, R. (2010). Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria. *The Open Toxinology Journal* 3, 101-118.
- Hochmann, H., Pust, S., von Figura, G., Aktories, K., and Barth, H. (2006). *Salmonella enterica* SpvB ADP-ribosylates actin at position arginine-177-characterization of the catalytic domain within the SpvB protein and a comparison to binary clostridial actin-ADP-ribosylating toxins. *Biochemistry* 45, 1271-1277.
- Hofmann, F., Busch, C., Prepens, U., Just, I., and Aktories, K. (1997). Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. *J Biol Chem* 272, 11074-11078.
- Holm, L., and Rosenstrom, P. (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* 38, W545-549.
- Hope, H. (1988). Cryocrystallography of biological macromolecules: a generally applicable method. *Acta Crystallogr B* 44 ( Pt 1), 22-26.
- Hurst, M.R., Beard, S.S., Jackson, T.A., and Jones, S.M. (2007). Isolation and characterization of the *Serratia entomophila* antifeeding prophage. *FEMS Microbiol Lett* 270, 42-48.
- Hurst, M.R., Glare, T.R., and Jackson, T.A. (2004). Cloning *Serratia entomophila* antifeeding genes--a putative defective prophage active against the grass grub *Costelytra zealandica*. *J Bacteriol* 186, 5116-5128.
- Hurst, M.R., Glare, T.R., Jackson, T.A., and Ronson, C.W. (2000). Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photorhabdus luminescens*. *J Bacteriol* 182, 5127-5138.
- Hurst, M.R., Jones, S.A., Binglin, T., Harper, L.A., Jackson, T.A., and Glare, T.R. (2011). The main virulence determinant of *Yersinia entomophaga* MH96 is a broad-host-range toxin complex active against insects. *J Bacteriol* 193, 1966-1980.

- James, M.N., and Sielecki, A.R. (1985). Stereochemical analysis of peptide bond hydrolysis catalyzed by the aspartic proteinase penicillopepsin. *Biochemistry* *24*, 3701-3713.
- Jeno, P., Mini, T., Moes, S., Hintermann, E., and Horst, M. (1995). Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* *224*, 75-82.
- Jensen, M.S., and Bainton, D.F. (1973). Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear neutrophilic leukocyte. *J Cell Biol* *56*, 379-388.
- Jo, S., Kim, T., and Im, W. (2007). Automated builder and database of protein/membrane complexes for molecular dynamics simulations. *PLoS One* *2*, e880.
- Jo, S., Lim, J.B., Klauda, J.B., and Im, W. (2009). CHARMM-GUI Membrane Builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. *Biophys J* *97*, 50-58.
- Jolley, R.L., and Freeman, M.L. (1968). Automated carbohydrate analysis of physiologic fluids. *Clin Chem* *14*, 538-547.
- Jones, T.A. (1978). A graphics model building and refinement system for macromolecules. *J Appl Crystallogr* *11*, 268-272.
- Kabsch, W. (2010). Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *66*, 125-132.
- Kantardjieff, K.A., and Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci* *12*, 1865-1871.
- Kartha, G. (1965). Combination of multiple isomorphous replacement and anomalous dispersion data for protein structure determination. 3. Refinement of heavy atom positions by the least-squares method. *Acta Crystallogr* *19*, 883-885.
- Kaya, H.K. (1978). Infectivity of *Neoaplectana carpocapsae* and *Heterorhabditis heliothidis* to pupae of the parasite *Apanteles militaris*. *J Nematol* *10*, 241-244.
- Kaya, H.K., and Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annu Rev Entomol* *38*, 181-206.
- 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., *et al.* (2007). Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* *130*, 906-917.
- Kim, Y., Ji, D., Cho, S., and Park, Y. (2005). Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, share an inhibitory action against phospholipase A2 to induce host immunodepression. *J Invertebr Pathol* *89*, 258-264.
- King, N.P., Yeates, E.O., and Yeates, T.O. (2007). Identification of rare slipknots in proteins and their implications for stability and folding. *J Mol Biol* *373*, 153-166.
- Knablein, J., Neufeind, T., Schneider, F., Bergner, A., Messerschmidt, A., Lowe, J., Steipe, B., and Huber, R. (1997). Ta6Br(2+)12, a tool for phase determination of large biological assemblies by X-ray crystallography. *J Mol Biol* *270*, 1-7.
- Kopec, K.O., and Lupas, A.N. (2013). beta-Propeller blades as ancestral peptides in protein evolution. *PLoS One* *8*, e77074.
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* *372*, 774-797.
- Kurata, S. (2014). Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Dev Comp Immunol* *42*, 36-41.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* *157*, 105-132.

- Lacy, D.B., Wigelsworth, D.J., Scobie, H.M., Young, J.A., and Collier, R.J. (2004). Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 6367-6372.
- Landreh, M., Askarieh, G., Nordling, K., Hedhammar, M., Rising, A., Casals, C., Astorga-Wells, J., Alvelius, G., Knight, S.D., Johansson, J., *et al.* (2010). A pH-dependent dimer lock in spider silk protein. *J Mol Biol* *404*, 328-336.
- Landsberg, M.J., Jones, S.A., Rothnagel, R., Busby, J.N., Marshall, S.D., Simpson, R.M., Lott, J.S., Hankamer, B., and Hurst, M.R. (2011). 3D structure of the *Yersinia entomophaga* toxin complex and implications for insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 20544-20549.
- Lang, A.E., Konukiewitz, J., Aktories, K., and Benz, R. (2013). TcdA1 of *Photobacterium luminescens*: electrophysiological analysis of pore formation and effector binding. *Biophys J* *105*, 376-384.
- Lang, A.E., Schmidt, G., Schlosser, A., Hey, T.D., Larrinua, I.M., Sheets, J.J., Mannherz, H.G., and Aktories, K. (2010). *Photobacterium luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science* *327*, 1139-1142.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* *23*, 2947-2948.
- Laskowski, R.A., Rullmann, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R., and Thornton, J.M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* *8*, 477-486.
- Laskowski, R.A., Watson, J.D., and Thornton, J.M. (2005). ProFunc: a server for predicting protein function from 3D structure. *Nucleic Acids Res* *33*, W89-93.
- Lavine, M.D., and Strand, M.R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* *32*, 1295-1309.
- Lee, S.C., Stoilova-McPhie, S., Baxter, L., Fulop, V., Henderson, J., Rodger, A., Roper, D.I., Scott, D.J., Smith, C.J., and Morgan, J.A. (2007). Structural characterisation of the insecticidal toxin XptA1, reveals a 1.15 MDa tetramer with a cage-like structure. *J Mol Biol* *366*, 1558-1568.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., Burley, S.K., Almo, S.C., and Mekalanos, J.J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 4154-4159.
- Leslie, A.G. (1999). Integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *55*, 1696-1702.
- Lewis, A.L., and Lewis, W.G. (2012). Host sialoglycans and bacterial sialidases: a mucosal perspective. *Cell Microbiol* *14*, 1174-1182.
- Liberek, K., Lewandowska, A., and Zietkiewicz, S. (2008). Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J* *27*, 328-335.
- Lin, R.J., Capage, M., and Hill, C.W. (1984). A repetitive DNA sequence, *rhs*, responsible for duplications within the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Mol Biol* *177*, 1-18.
- Low, B.W., Chen, C.C., Berger, J.E., Singman, L., and Pletcher, J.F. (1966). Studies of insulin crystals at low temperatures: effects on mosaic character and radiation sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *56*, 1746-1750.
- Marokhazi, J., Koczan, G., Hudecz, F., Graf, L., Fodor, A., and Venekei, I. (2004). Enzymic

- characterization with progress curve analysis of a collagen peptidase from an entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus luminescens*. *Biochem J* **379**, 633-640.
- Marokhazi, J., Lengyel, K., Pekar, S., Felfoldi, G., Patthy, A., Graf, L., Fodor, A., and Venekei, I. (2004). Comparison of proteolytic activities produced by entomopathogenic *Photorhabdus* bacteria: strain- and phase-dependent heterogeneity in composition and activity of four enzymes. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7311-7320.
- Massaoud, M.K., Marokhazi, J., Fodor, A., and Venekei, I. (2010). Proteolytic enzyme production by strains of the insect pathogen *xenorhabdus* and characterization of an early-log-phase-secreted protease as a potential virulence factor. *Appl Environ Microbiol* **76**, 6901-6909.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674.
- McCoy, A.J., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2004). Simple algorithm for a maximum-likelihood SAD function. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 1220-1228.
- McPherson, A., Jr. (1976). The growth and preliminary investigation of protein and nucleic acid crystals for X-ray diffraction analysis. *Methods Biochem Anal* **23**, 249-345.
- Meusch, D., Gatsogiannis, C., Efremov, R.G., Lang, A.E., Hofnagel, O., Vetter, I.R., Aktories, K., and Raunser, S. (2014). Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail. *Nature accepted*.
- Minet, A.D., Rubin, B.P., Tucker, R.P., Baumgartner, S., and Chiquet-Ehrismann, R. (1999). Teneurin-1, a vertebrate homologue of the *Drosophila* pair-rule gene *ten-m*, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. *J Cell Sci* **112** (Pt 12), 2019-2032.
- Morgan, J.A., Sergeant, M., Ellis, D., Ousley, M., and Jarrett, P. (2001). Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2062-2069.
- Motohashi, K., Watanabe, Y., Yohda, M., and Yoshida, M. (1999). Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-GrpE set and ClpB chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7184-7189.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordonez, C.L., Lory, S., *et al.* (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**, 1526-1530.
- Moustafa, I., Connaris, H., Taylor, M., Zaitsev, V., Wilson, J.C., Kiefel, M.J., von Itzstein, M., and Taylor, G. (2004). Sialic acid recognition by *Vibrio cholerae* neuraminidase. *J Biol Chem* **279**, 40819-40826.
- Muller, Y.A., Heiring, C., Misselwitz, R., Welfle, K., and Welfle, H. (2002). The cystine knot promotes folding and not thermodynamic stability in vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **277**, 43410-43416.
- Mulnix, A.B., and Dunn, P.E. (1994). Structure and induction of a lysozyme gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* **24**, 271-281.
- Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T., and Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* **247**, 536-540.
- Nelson, B.H., and Willerford, D.M. (1998). Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* **70**, 1-81.
- Odinokov, G.N., Eroshenko, G.A., Krasnov Ia, M., Guseva, N.P., and Kuttyrev, V.V. (2011).

- [Analysis of insect toxin complex gene variability of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains]. *Genetika* 47, 10-17.
- Ohi, M., Li, Y., Cheng, Y., and Walz, T. (2004). Negative Staining and Image Classification - Powerful Tools in Modern Electron Microscopy. *Biol Proced Online* 6, 23-34.
- Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K., and Satow, Y. (2007). Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science* 316, 1632-1634.
- Owen, R.L., Rudino-Pinera, E., and Garman, E.F. (2006). Experimental determination of the radiation dose limit for cryocooled protein crystals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4912-4917.
- Park, B.S., and Lee, J.O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* 45, e66.
- Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.S., Lee, H., and Lee, J.O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458, 1191-1195.
- Park, Y., Kim, Y., Putnam, S.M., and Stanley, D.W. (2003). The bacterium *Xenorhabdus nematophilus* depresses nodulation reactions to infection by inhibiting eicosanoid biosynthesis in tobacco hornworms, *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* 52, 71-80.
- Park, Y., Kim, Y., Tunaz, H., and Stanley, D.W. (2004). An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits hemocytic phospholipase A2 (PLA2) in tobacco hornworms *Manduca sexta*. *J Invertebr Pathol* 86, 65-71.
- Pellegrini-Calace, M., Maiwald, T., and Thornton, J.M. (2009). PoreWalker: a novel tool for the identification and characterization of channels in transmembrane proteins from their three-dimensional structure. *PLoS Comput Biol* 5, e1000440.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., and Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
- Petosa, C., Collier, R.J., Klimpel, K.R., Leppla, S.H., and Liddington, R.C. (1997). Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* 385, 833-838.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.
- Pettersson, C., and Schill, G. (1981). Separation of enantiomeric amines by ion-pair chromatography. *J Chromatogr* 204, 179-183.
- Pinheiro, V.B., and Ellar, D.J. (2007). Expression and insecticidal activity of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Photorhabdus luminescens* toxin complex proteins. *Cell Microbiol* 9, 2372-2380.
- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., and Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* 7, 95-99.
- Raymond, S. (1964). Acrylamide Gel Electrophoresis. *Ann N Y Acad Sci* 121, 350-365.
- Ribeiro, C., Vignes, M., and Brehelin, M. (2003). *Xenorhabdus nematophila* (enterobacteriaceae) secretes a cation-selective calcium-independent porin which causes vacuolation of the rough endoplasmic reticulum and cell lysis. *J Biol Chem* 278, 3030-3039.
- Rodou, A., Ankrah, D.O., and Stathopoulos, C. (2010). Toxins and secretion systems of *Photorhabdus luminescens*. *Toxins (Basel)* 2, 1250-1264.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C., and Ferrara, P. (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal*

Biochem 203, 173-179.

Rossmann, M.G. (1995). Ab initio phase determination and phase extension using non-crystallographic symmetry. *Curr Opin Struct Biol* 5, 650-655.

Ruchel, R., Mesecke, S., Wolfrum, D.I., and Neuhoff, V. (1973). [Micro-electrophoresis on continuous polyacrylamide gradient gels, I. Production and quality of gel gradients in capillaries, their application for fractionation of proteins and molecular weight determination (author's transl)]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 354, 1351-1368.

Rybakova, D., Radjainia, M., Turner, A., Sen, A., Mitra, A.K., and Hurst, M.R. (2013). Role of antifeeding prophage (Afp) protein Afp16 in terminating the length of the Afp tailocin and stabilizing its sheath. *Mol Microbiol* 89, 702-714.

Saridakis, E.E., Stewart, P.D., Lloyd, L.F., and Blow, D.M. (1994). Phase diagram and dilution experiments in the crystallization of carboxypeptidase G2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 293-297.

Schlieker, C., Weibezahn, J., Patzelt, H., Tessarz, P., Strub, C., Zeth, K., Erbse, A., Schneider-Mergener, J., Chin, J.W., Schultz, P.G., *et al.* (2004). Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nat Struct Mol Biol* 11, 607-615.

Schmidt, P.G., Holladay, M.W., Salituro, F.G., and Rich, D.H. (1985). Identification of oxygen nucleophiles in tetrahedral intermediates: 2H and 18O induced isotope shifts in 13C NMR spectra of pepsin-bound peptide ketone pseudosubstrates. *Biochem Biophys Res Commun* 129, 597-602.

Schmidt, T.M., Kopecky, K., and Neilson, K.H. (1989). Bioluminescence of the insect pathogen *Xenorhabdus luminescens*. *Appl Environ Microbiol* 55, 2607-2612.

Scobie, H.M., and Young, J.A. (2005). Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen. *Curr Opin Microbiol* 8, 106-112.

Shapiro, A.L., Vinuela, E., and Maizel, J.V., Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28, 815-820.

Sheets, J.J., Hey, T.D., Fencil, K.J., Burton, S.L., Ni, W., Lang, A.E., Benz, R., and Aktories, K. (2011). Insecticidal toxin complex proteins from *Xenorhabdus nematophilus*: structure and pore formation. *J Biol Chem* 286, 22742-22749.

Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P., and Gouaux, E. (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462, 745-756.

Somvanshi, V.S., Sloup, R.E., Crawford, J.M., Martin, A.R., Heidt, A.J., Kim, K.S., Clardy, J., and Ciche, T.A. (2012). A single promoter inversion switches *Photobacterium* between pathogenic and mutualistic states. *Science* 337, 88-93.

Spinner, J.L., Jarrett, C.O., LaRock, D.L., Miller, S.I., Collins, C.M., and Hinnebusch, B.J. (2012). *Yersinia pestis* insecticidal-like toxin complex (Tc) family proteins: characterization of expression, subcellular localization, and potential role in infection of the flea vector. *BMC Microbiol* 12, 296.

Strong, M., Sawaya, M.R., Wang, S., Phillips, M., Cascio, D., and Eisenberg, D. (2006). Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8060-8065.

Sulea, T., and Purisima, E.O. (2003). Profiling charge complementarity and selectivity for binding at the protein surface. *Biophys J* 84, 2883-2896.



- Sun, S.C., Lindstrom, I., Boman, H.G., Faye, I., and Schmidt, O. (1990). Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* *250*, 1729-1732.
- Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Munakata, H., Nakamura, M., and Sugamura, K. (1992). Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science* *257*, 379-382.
- Tanford, C.H. (1980). *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. John Wiley & Sons Inc, New York, 1-233.
- Terwilliger, T.C. (2000). Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *56*, 965-972.
- Terwilliger, T.C. (2010). Rapid model building of alpha-helices in electron-density maps. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *66*, 268-275.
- Terwilliger, T.C., Adams, P.D., Read, R.J., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Grosse-Kunstleve, R.W., Afonine, P.V., Zwart, P.H., and Hung, L.W. (2009). Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *65*, 582-601.
- Thomas, C., Moraga, I., Levin, D., Krutzik, P.O., Podoplelova, Y., Trejo, A., Lee, C., Yarden, G., Vleck, S.E., Glenn, J.S., *et al.* (2011). Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell* *146*, 621-632.
- Tian, Y.Y., Liu, Y., Zhao, X.F., and Wang, J.X. (2009). Characterization of a C-type lectin from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Dev Comp Immunol* *33*, 772-779.
- Torr, P., Heritage, S., and Wilson, M.J. (2004). Vibrations as a novel signal for host location by parasitic nematodes. *Int J Parasitol* *34*, 997-999.
- Toth, E.A. (2007). Molecular replacement. *Methods Mol Biol* *364*, 121-148.
- Vaguine, A.A., Richelle, J., and Wodak, S.J. (1999). SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *55*, 191-205.
- Varghese, J.N., Laver, W.G., and Colman, P.M. (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* *303*, 35-40.
- Vigneux, F., Zumbihl, R., Jubelin, G., Ribeiro, C., Poncet, J., Baghdiguan, S., Givaudan, A., and Brehelin, M. (2007). The xaxAB genes encoding a new apoptotic toxin from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* are present in plant and human pathogens. *J Biol Chem* *282*, 9571-9580.
- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* *83*, 1047-1058.
- Wang, B.C. (1985). Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. *Methods Enzymol* *115*, 90-112.
- Wang, H.M., and Smith, K.A. (1987). The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. *J Exp Med* *166*, 1055-1069.
- Wang, X., Rickert, M., and Garcia, K.C. (2005). Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. *Science* *310*, 1159-1163.
- Waterfield, N., Hares, M., Hinchliffe, S., Wren, B., and French-Constant, R. (2007). The insect toxin complex of *Yersinia*. *Adv Exp Med Biol* *603*, 247-257.
- Waterfield, N., Hares, M., Yang, G., Dowling, A., and French-Constant, R. (2005). Potentiation

and cellular phenotypes of the insecticidal Toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. *Cell Microbiol* 7, 373-382.

Waterfield, N., Kamita, S.G., Hammock, B.D., and French-Constant, R. (2005). The *Photorhabdus* Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. *FEMS Microbiol Lett* 245, 47-52.

Waterfield, N.R., Daborn, P.J., Dowling, A.J., Yang, G., Hares, M., and French-Constant, R.H. (2003). The insecticidal toxin makes caterpillars floppy 2 (Mcf2) shows similarity to HrmA, an avirulence protein from a plant pathogen. *FEMS Microbiol Lett* 229, 265-270.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.

Weiner, J., 3rd, Beaussart, F., and Bornberg-Bauer, E. (2006). Domain deletions and substitutions in the modular protein evolution. *FEBS J* 273, 2037-2047.

Wilkinson, P., Waterfield, N.R., Crossman, L., Corton, C., Sanchez-Contreras, M., Vlisidou, I., Barron, A., Bignell, A., Clark, L., Ormond, D., *et al.* (2009). Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*. *BMC Genomics* 10, 302.

Wilson, C.M. (1979). Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R, and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 96, 263-278.

Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., *et al.* (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 235-242.

Xiong, J.P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., and Arnaout, M.A. (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296, 151-155.

Yang, G., Dowling, A.J., Gerike, U., French-Constant, R.H., and Waterfield, N.R. (2006). *Photorhabdus* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. *J Bacteriol* 188, 2254-2261.

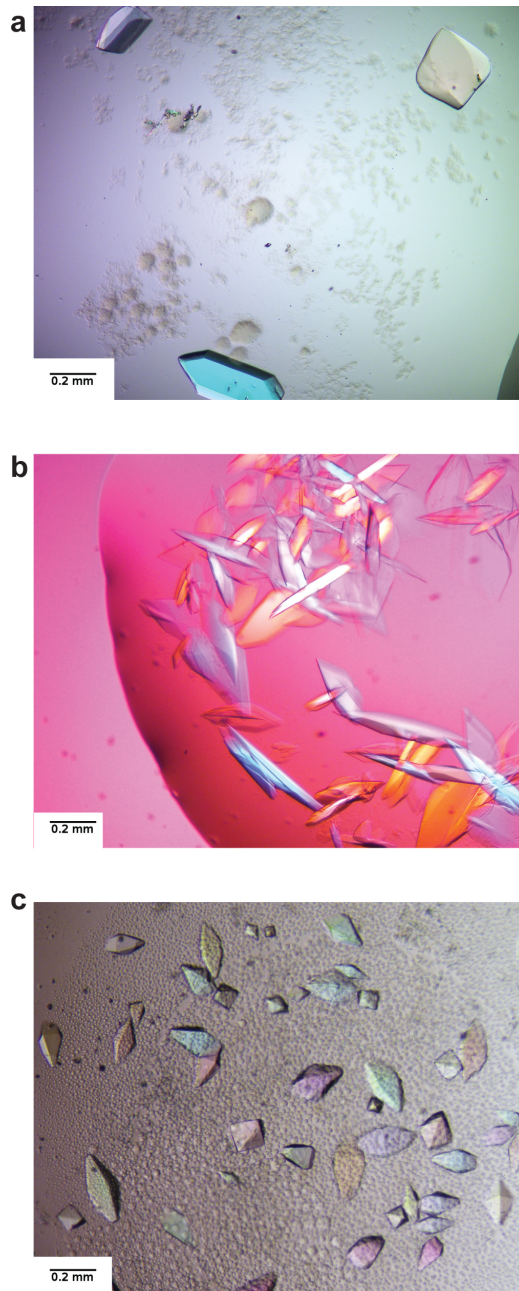
Yang, G., and Waterfield, N.R. (2013). The role of TcdB and TccC subunits in secretion of the *Photorhabdus* Tcd toxin complex. *PLoS Pathog* 9, e1003644.

Zhang, X., Hu, X., Li, Y., Ding, X., Yang, Q., Sun, Y., Yu, Z., Xia, L., and Hu, S. (2013). XaxAB-like binary toxin from *Photorhabdus luminescens* exhibits both insecticidal activity and cytotoxicity. *FEMS Microbiol Lett*.

Zhang, Z., and Marshall, A.G. (1998). A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J Am Soc Mass Spectrom* 9, 225-233.

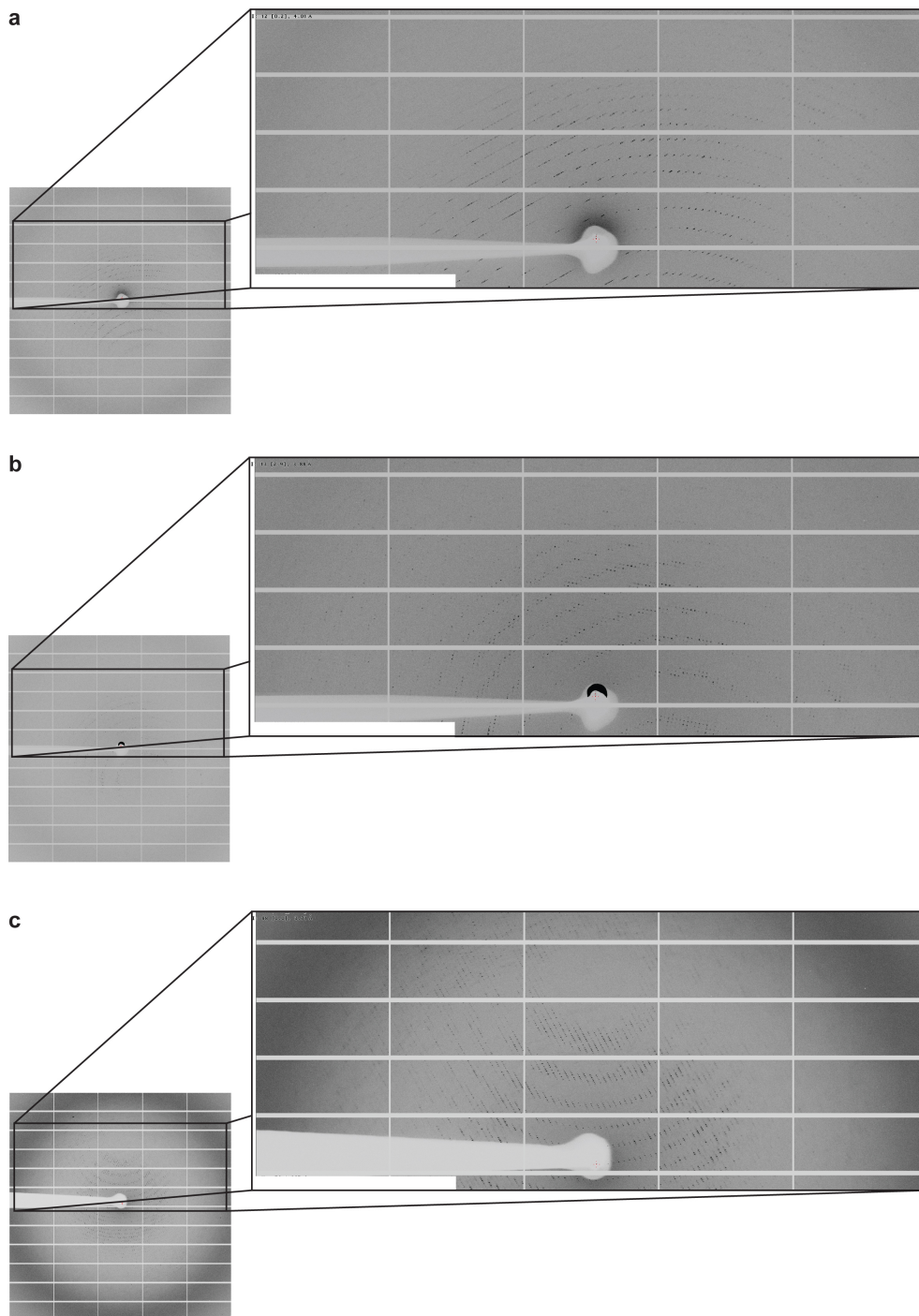
Zhao, P., Li, J., Wang, Y., and Jiang, H. (2007). Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated in vitro by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochem Mol Biol* 37, 952-959.

## 7 ANHANG



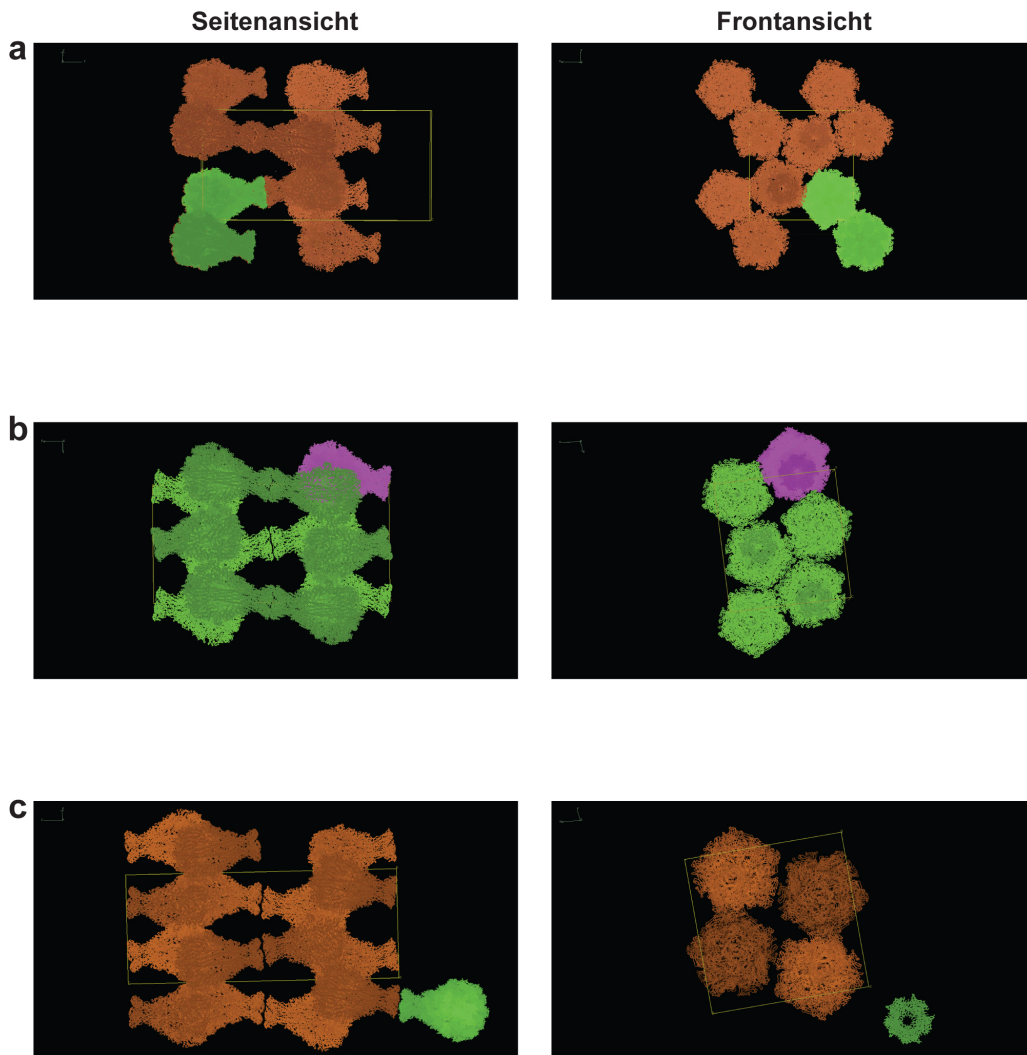
**Abb. 47: Kristallisation von TcdA1 in unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen**

TcdA1 kristallisiert in Bedingungen, die zu drei unterschiedlichen Kristallformen führen. TcdA1-Kristalle in (a) gereinigt bei pH 5 (A-Kristalle) wachsen in TcdA1-Kristallisationsbuffer I, wohingegen Kristalle in (b) gereinigt bei pH 8 (B-Kristalle) und in (c) gereinigt bei pH 5 (C-Kristalle) in TcdA1-Kristallisationspuffer II wachsen.



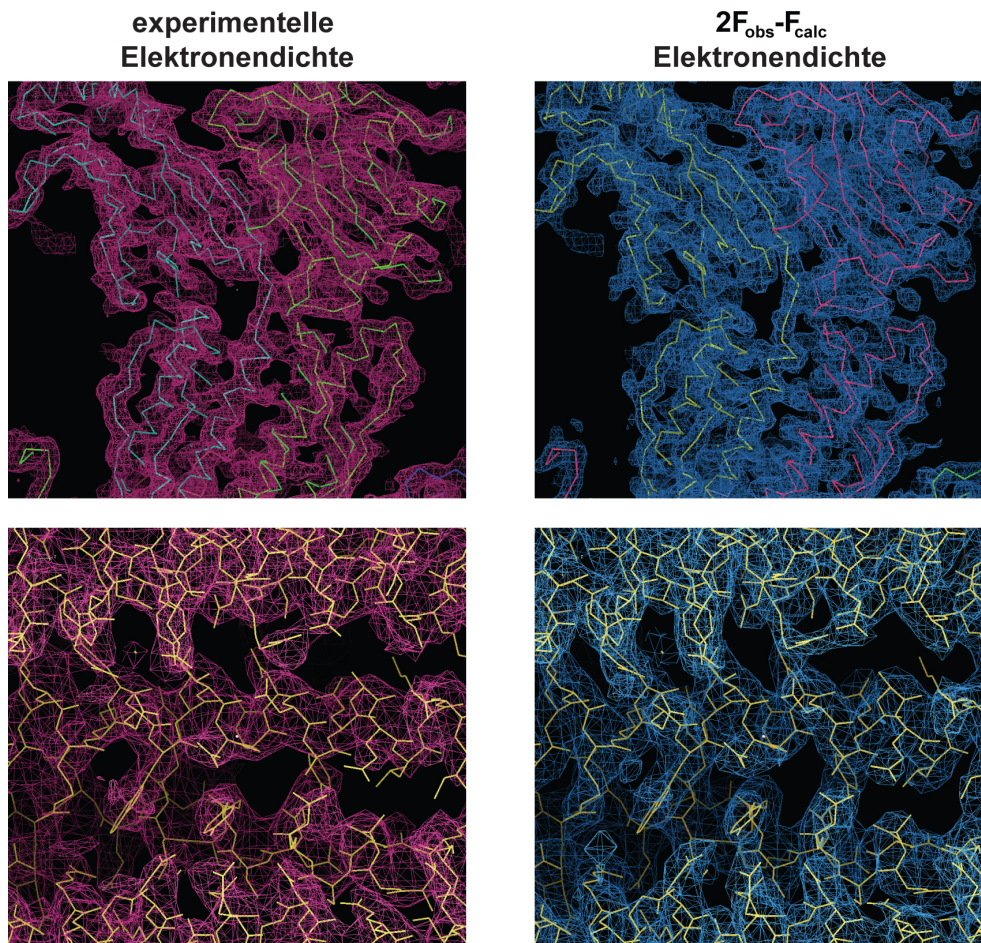
**Abb. 48: Optimierte Röntgenbeugungsexperimente an A-, B- und C-Kristallen von TcdA1**

TcdA1-Röntgenbeugungsbilder von (a) A-, (b) B- und (c) C-Kristallen aufgenommen an Messstation/Strahllinie PXII-X10SA des Elektronenbeschleunigers SLS, Schweiz. Die vergrößerten Ausschnitte (rechts) zeigen ein detailliertes Röntgenbeugungsmuster mit scharfen, runden und voneinander getrennten Reflexen in einem sauberen Kristallgitter.



**Abb. 49: Seiten- und Frontansicht der TcdA1-Einheitszelle von A-, B- und C-Kristallen**

Seiten- (linke Spalte) und Frontansicht (rechte Spalte) der TcdA1-Einheitszellausmaße (gelb gerahmt) in (a) A-, (b) B- und (c) C-Kristallen. (a) Zwei TcdA1-Pentamere (grün) bilden eine asymmetrische Einheit in Raumgruppe  $P2_12_12_1$  in einem A-Kristallgitter, wohingegen in (b) und (c) nur ein TcdA1-Pentamer (b=pink, c=grün) pro asymmetrische Einheit ein B-Kristallgitter mit Raumgruppe  $C222_1$  und ein C-Kristallgitter mit Raumgruppe  $P4_22_12$  aufbaut. Die Symmetrieverwandten sind in (a) und (c) in braun sowie in (b) in grün dargestellt.

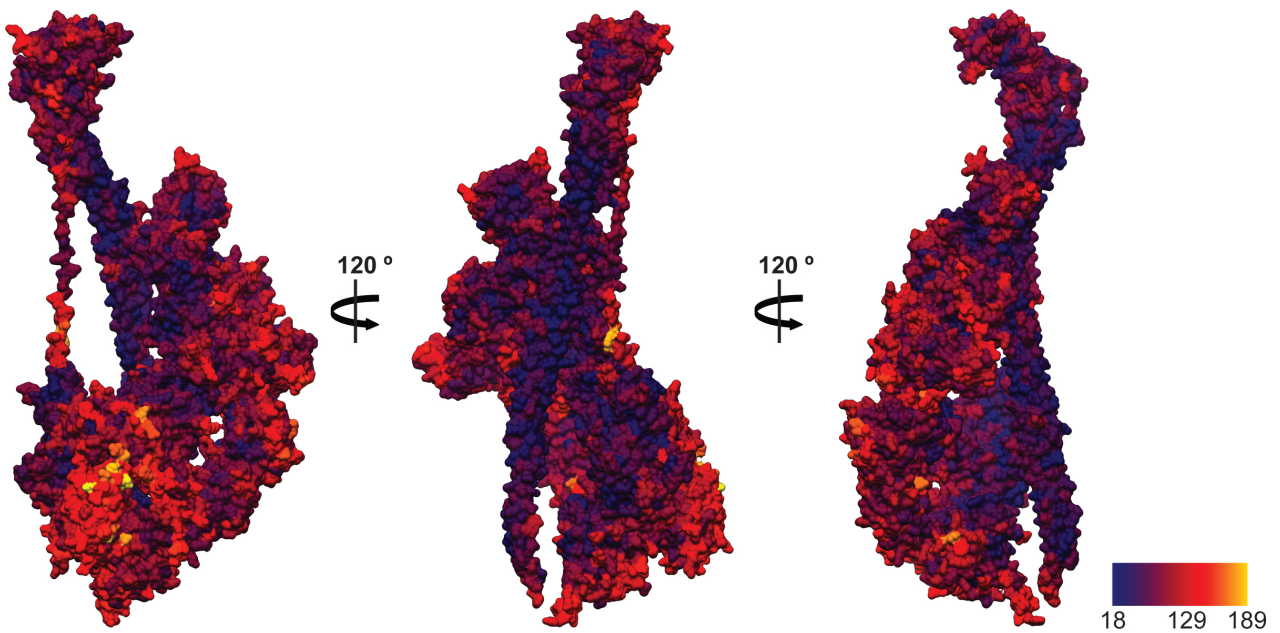


**Abb. 50: Experimentelle und verfeinerte Elektronendichtekarte der A-Kristalle von TcdA1**

Darstellung zweier Ausschnitte einer experimentell-phasierten (rot) und verfeinerten  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarte (blau) eines TcdA1-Pentamers. Die Dichtekarten der oberen Reihe zeigen das Peptidrückgrat beim Übergang von der porenbildenden in die TcB-bindende Domäne, die der unteren Reihe zeigen einen detaillierten Ausschnitt der Aminosäuren und deren Seitenketten aus der porenbildenden Domäne. Alle Elektronendichtekarten wurden bei einem  $\sigma$  von 1,5 umrissen.

**Tab. 8: Kristallographische Zusammenfassung der Röntgenbeugungsexperimente von A-, B- und C-Kristallen des TcdA1-Pentamers**

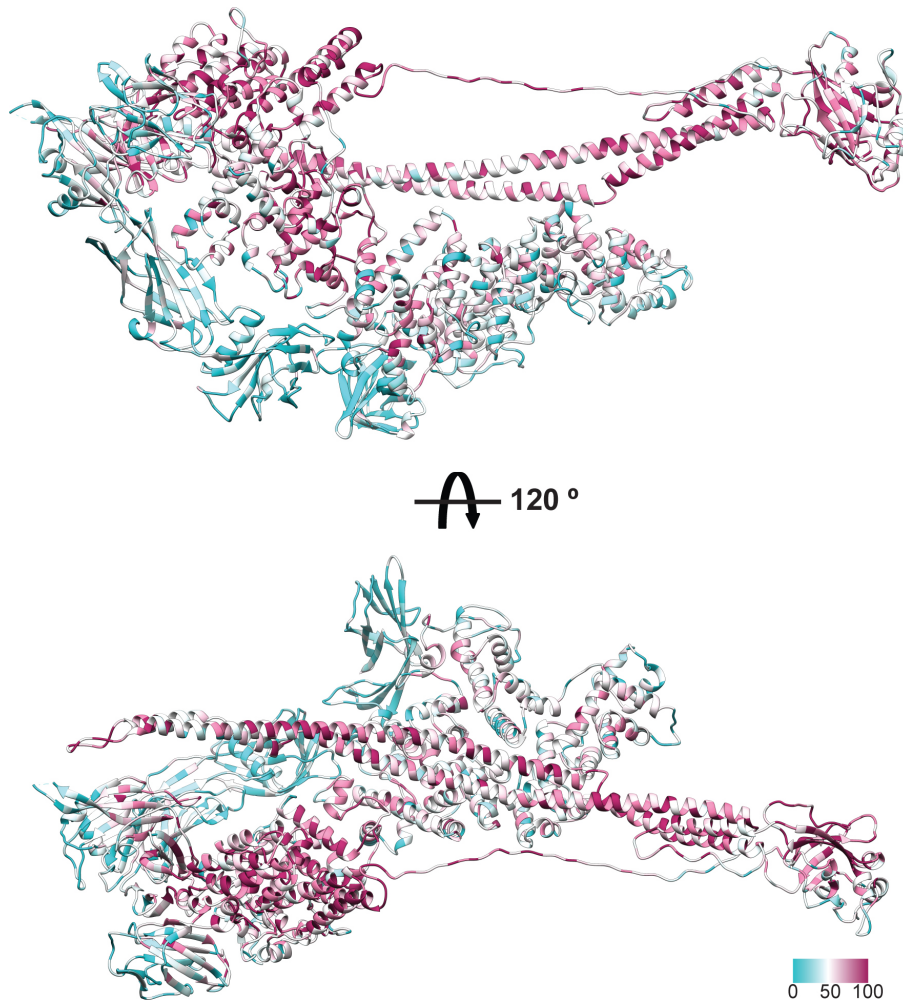
	TcdA1		
	A-Kristalle	B-Kristalle	C-Kristalle
<b>Datenaufnahme</b>			
Raumgruppe	P212121	P42212	C2221
Einheitszelle			
a, b, c (Å)	303,25, 320,73, 667,62	307,12, 307,12, 751,38	296,34, 631,78, 318,18
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Wellenlänge (Å)	0,97939	1,00000	1,00000
Auflösung (Å) *	78-4,0 (4,22-4,0)	30-7,0 (7,5-7,0)	30-7,0 (7,5-7,0)
R <sub>merge</sub> *	5,2 (185)	127,8 (143,1)	127,9 (147)
I / $\sigma$ *	6,0 (1,2)	1,72 (1,75)	1,13 (1,48)
Vollständigkeit (%) *	99,7 (98,8)	99,8 (100)	68,9 (71,2)
CC <sub>1/2</sub> (%) *	99,6 (60,5)	90,4 (51,3)	90,0 (56,2)
Redundanz *	8,9 (7,1)	6,4 (6,6)	6,4 (6,5)
<b>Skalierung der Anisotropie-korrigierten Daten</b>			
Resolution (Å) *	78-3,5 (3,69-3,50)		
R <sub>merge</sub> *	72,9 (369)		
I / $\sigma$ *	4,2 (0,4)		
Completeness (%) *	99,1 (97,3)		
CC <sub>1/2</sub> (%) *	86,7 (11,5)		
Redundancy *	8.3 (6,9)		
Completeness after anisotropic truncation *	78.29 (15,4)		
<b>Datenverfeinerung</b>			
Auflösung (Å)	20-3,7/4,2/3,5		
Anzahl Reflexe	628863		
R <sub>work</sub> / R <sub>free</sub>	0,2426/0,2950		
Moleküle pro AU	2		
Anzahl Atome	197663		
Protein	197663		
Ligand / Ionen	-		
Wasser	-		
Anzahl Aminosäurereste	24898		
B-Faktoren (Å <sup>2</sup> )	69,50		
Protein	69,50		
Ligand / Ionen	-		
Wasser	-		
<b>RMSD</b>			
Bond lengths (Å)	0,008		
Bond angles (°)	1,335		



**Abb. 51: B-Faktorverteilung in einem TcdA1-Präporen-Protomer**

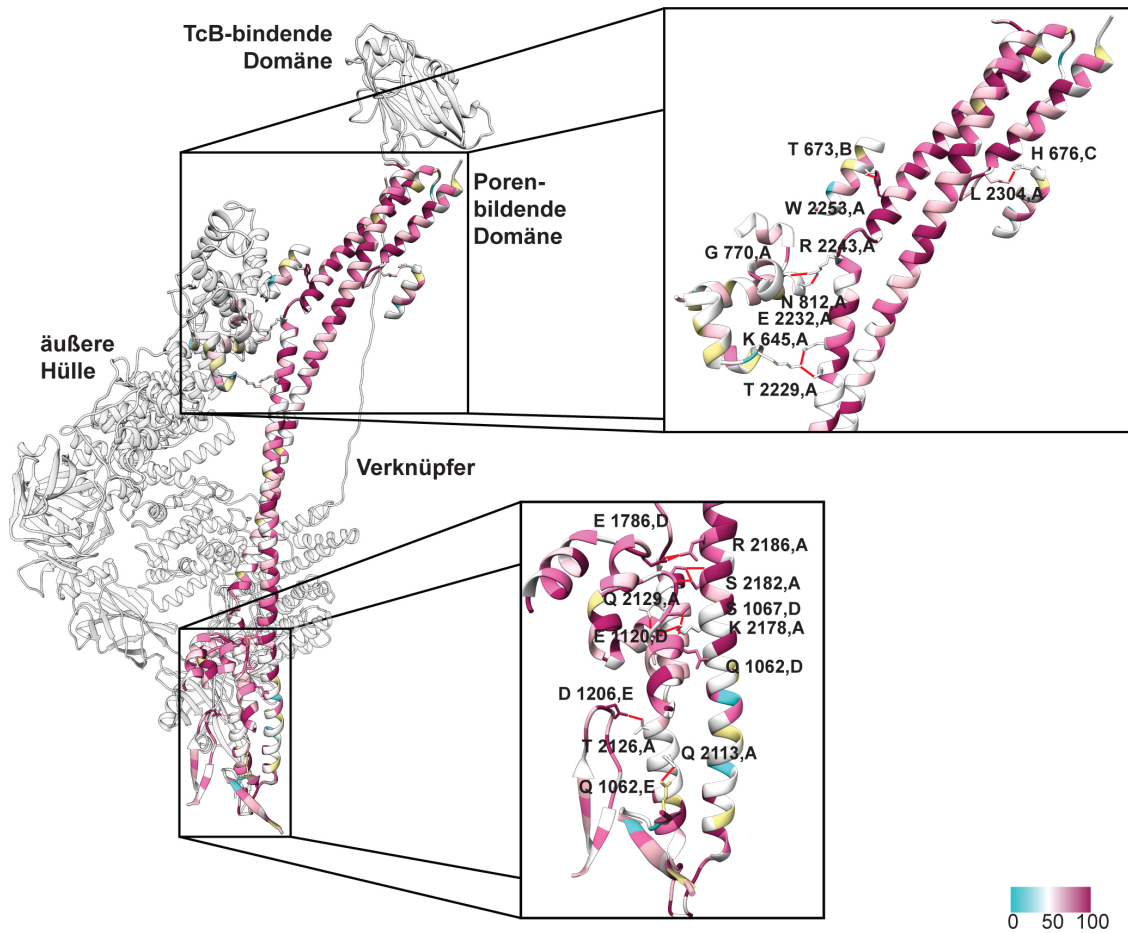
Die Aminosäurereste eines TcdA1-Präpore-Protomers sind anhand ihrer B-Faktorverteilung (in Å<sup>2</sup>) eingefärbt. Dunkelblaue Bereiche zeigen niedrige B-Faktoren, wohingegen gelbe Bereiche hohe B-Faktoren andeuten.





**Abb. 52: Modell der Konservierung eines TcdA1-Präporen-Protomers**

Der Grad der Aminosäurekonservierung (0 bis 100 %) eines TcdA1-Präpore-Protomers wird nach einem Sequenzvergleich gegen 16 homologe A-Komponenten insekt-, pflanzen- und humanpathogener Prokaryonten dargestellt.



**Abb. 53: Konservierungsgrad und Interaktionsfläche von Aminosäuren einer porenbildenden Domäne mit benachbarten TcdA1-Präpore-Protomeren**

Die Interaktionen der Aminosäuren einer Porenbildenden Domäne mit Aminosäuren aus benachbarten TcdA1-Protomeren werden nach ihrem Konservierungsgrad (0 bis 100 %) dargestellt und eingefärbt.

**Tab. 9: Vorkommen von TcdA1-Prärporen-Domänen in homologen A-Komponenten insektpathogener Prokaryonten**























Das Vorkommen von potentiellen Domänen in homologen A-Komponenten von elf insektpathogenen Prokaryonten wird anhand Sequenzvergleiche aufgrund von Konservierungsergebnissen ermittelt. Die Domänen 1 bis 8 sind anhand ihres Farbkodes (siehe Abb. 17) eingefärbt. Vorhandene Domänen sind mit einem „+“ (schwarz) und fehlende Domänen mit einem „-“ (rot) markiert.

Protein	Organismus	Domäne							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Insektenpathogene</i>									
TcdA1	<i>Photorhabdus luminescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
TcdA2	<i>Photorhabdus luminescens</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
TcdA4	<i>Photorhabdus luminescens</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
TcaA/B	<i>Photorhabdus luminescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
TcbA	<i>Photorhabdus luminescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
TccA/B	<i>Photorhabdus luminescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
TcdA2	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
TcdA5	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
TccA/B	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
XptA1	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
XptA2	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
TcdA	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
TccA/B	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
XptA2	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
TccA/B	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
YenA1/A2	<i>Yersinia entomophaga</i>	+	+	+	-	-	-	+	+
SepA	<i>Serratia entomophila</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
SppA	<i>Serratia proteamaculans</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
TccA/B	<i>Pseudomonas entomophila</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
TcaA/B	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
TcdA	<i>Vibrio owensii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
TccA/B	<i>Paenibacillus alvei</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
TcaA/B	<i>Paenibacillus alvei</i>	+	+	+	-	-	-	+	+



**Tab. 11: Interaktionsflächen in Protomeren, Kanal, Hülle und Domänen einer TcdA1-Präpore**

Darstellung der Interaktionsflächen sowie deren dazu beitragenden Wasserstoff- und Salzbrücken in der TcdA1-Präporenkonformation. Die Farbkodierung der Domänen eines TcdA1-Protomers wurden aus Abb. 17 übernommen.

TcdA1 Präpore							
Grenzfläche		Aminosäure-Reste		Lösemittel-zugängl. Fläche (Å <sup>2</sup> )	Wasserstoff-brücken	Salz-brücken	Freie Solvatations-energie (kcal/mol)
<i>Protomer</i>		<i>#1</i>	<i>#2</i>				
A	B	327	351	11301	108	40	-88.3
A	C	49	50	1417	13	2	-5.9
A	D	50	49	1374	12	2	-6.3
A	E	352	330	11448	109	44	-87.9
<i>Kanal</i>		<i>#1</i>	<i>#2</i>				
A	B	137	134	5131	55	22	-58.4
<i>Hülle</i>		<i>#1</i>	<i>#2</i>				
A	B	150	168	4906	47	19	-19.0
<i>Domäne</i>		<i>#1</i>	<i>#2</i>				
1 	2 	33	28	1035	17	5	-0.8
1 	3 	40	40	1456	15	1	-13.2
1 	4 	16	18	431	8	0	1.3
1 	5 	17	17	518	4	0	-3.2
1 	6 	19	14	558	3	0	-3.7
1 	7 	19	15	464	7	2	-1.9
2 	5 	3	4	66	0	0	-1.5
3 	4 	18	17	600	6	5	0.9
3 	6 	30	28	1003	10	3	-3.9
4 	5 	23	26	895	15	2	-8.8
7 	8 	14	24	817	7	4	-7.4

**Tab. 12: Interaktionsfläche einer Poren-bildenden mit benachbarten Poren-bildenden Domänen in einem TcdA1-Translokationskanal**

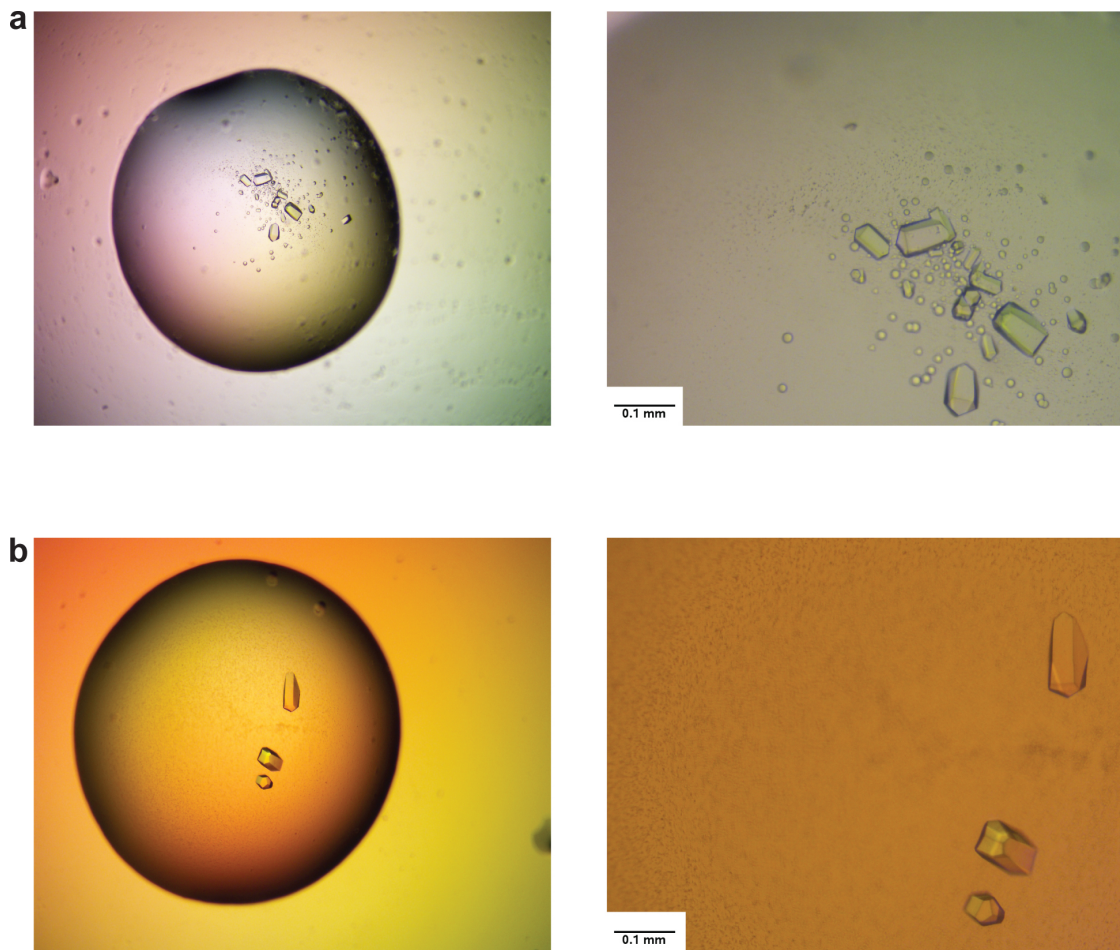
Protomer-Protomer-Grenzfläche		Aminosäure-Reste		Lösemittel-zugängliche Fläche (Å <sup>2</sup> )		Wasserstoffbrücken		Salzbrücken		Freie Solvatationsenergie (kcal/mol)	
<i>TcdA-Translokationskanal</i>		#1	#2	Grenz-	Gesamt-						
Protomer A	Protomer B	137	134	5131	34068	55	22			-58.4	

**Tab. 13: Interaktionsfläche einer poren-bildenden Domäne mit benachbarten Domänen der äußeren Hülle**

Protomer-Protomer-Grenzfläche		Aminosäure-Reste		Lösemittel-zugängliche Fläche (Å <sup>2</sup> )		Wasserstoffbrücken		Salzbrücken		Freie Solvationsenergie (kcal/mol)	
<i>TcdA-Translokationskanal</i>		#1	#2	Grenz-	Gesamt-						
Protomer A	Hülle A	5	8	117	108824	4	1			2.7	
Protomer A	Hülle B	15	15	416	109080	1	0			-3.1	
Protomer A	Hülle C	7	7	211	108739	1	0			1.8	
Protomer A	Hülle D	36	31	956	109341	7	2			-7.4	
Protomer A	Hülle E	20	23	586	108730	2	0			-6.7	

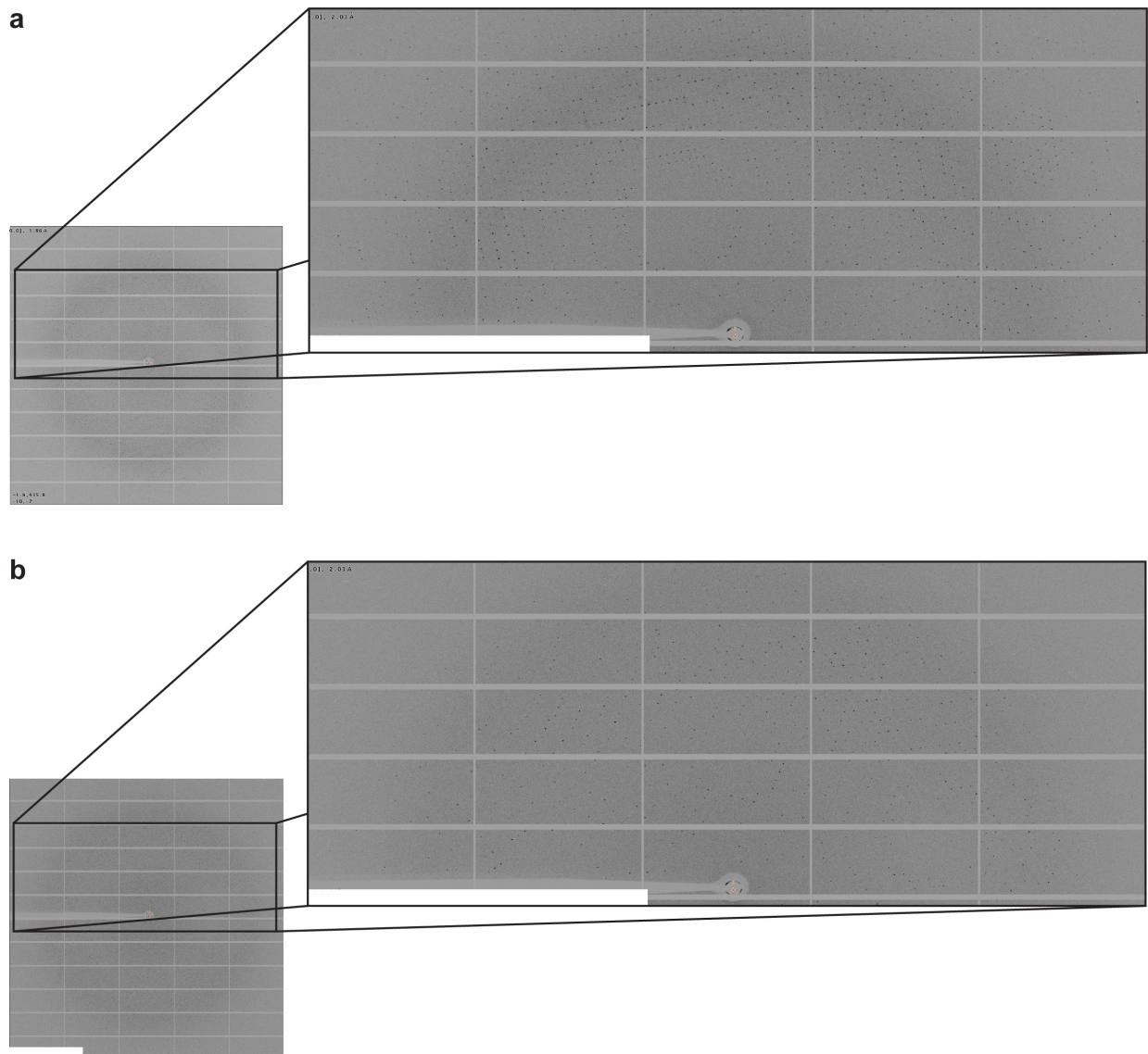
**Tab. 14: Interaktionsfläche einer Verknüpfersdomäne mit benachbarten Domänen aller Protomere**

Verknüpfers-Protomer-Grenzfläche		Aminosäure-Reste		Lösemittel-zugängliche Fläche (Å <sup>2</sup> )		Wasserstoffbrücken		Salzbrücken		Freie Solvationsenergie (kcal/mol)	
<i>Verknüpfers</i>		#1	#2	Grenz-	Gesamt-						
Verknüpfers A	Hülle A	7	12	384	93036	4	2			-3.7	
Verknüpfers A	Hülle B	11	20	419	93292	3	0			-2.4	
Verknüpfers A	Hülle C	9	8	245	92951	5	0			-0.8	
Verknüpfers A	Kanal A	14	22	625	26272	4	1			-9.9	
Verknüpfers A	Kanal B	13	15	414	26246	4	0			-4.7	
Verknüpfers A	Kanal C	1	1	32.6	26345	0	0			0.7	
Verknüpfers A	Kanal E	2	2	67	26408	0	0			-1.6	



**Abb. 54: Kristallisation von TcdB2-TccC3 in zwei Kristallisationsbedingungen**

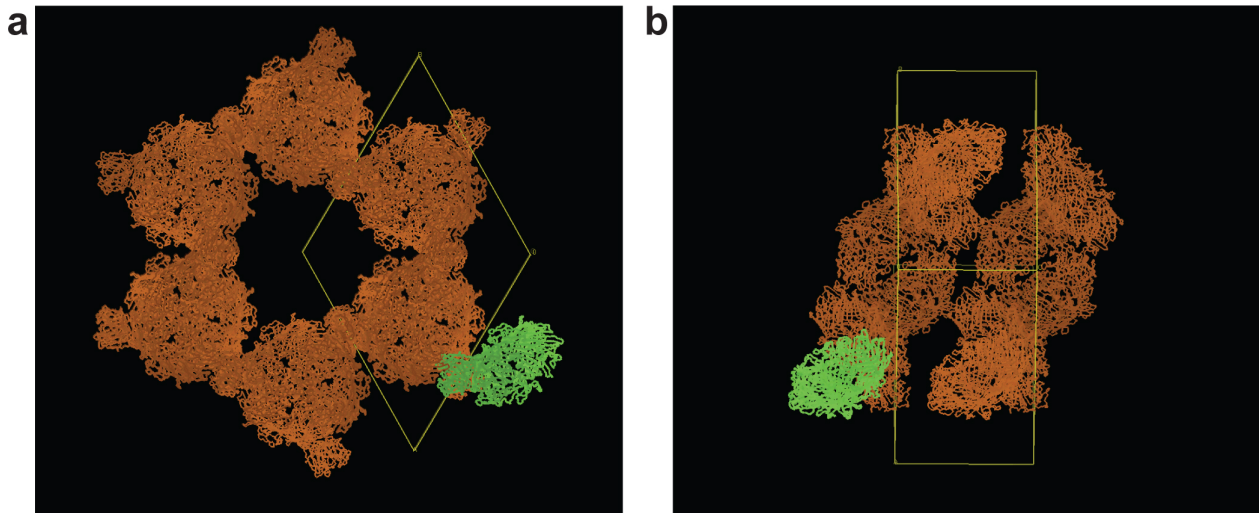
Reproduktion von TcdB2-TccC3-Kristallen in 24-Loch-Format in (a) TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer I und (b) TcdB2-TccC3-Kristallisationspuffer II nach Größenausschlusschromatographie in TcdB2-TccC3-SEC-Puffer bei pH 8.



**Abb. 55: Röntgenbeugungsexperimente an TcdB2-TccC3-Kristallen**

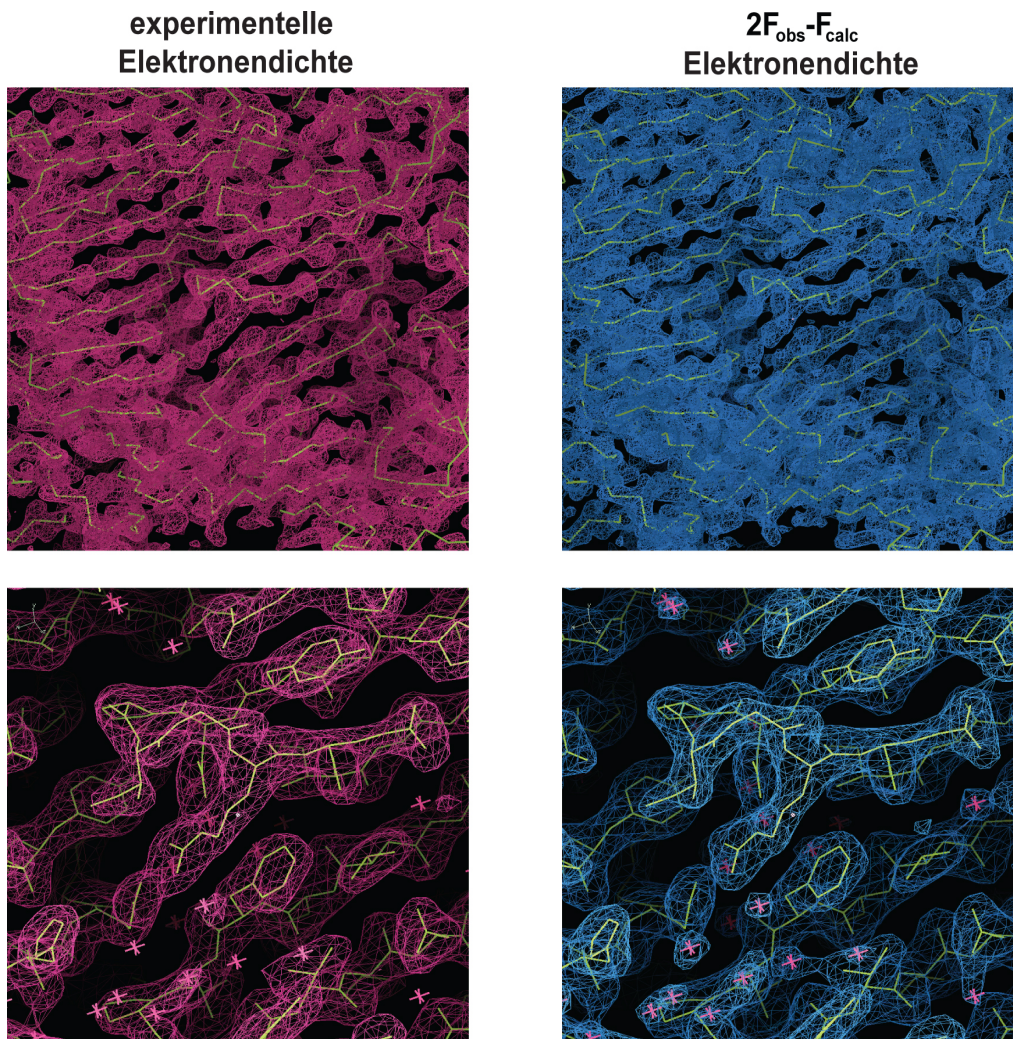
TcdA1-Röntgenbeugungsbilder von (a) nativen TcdB2-TccC3-Kristallen und (b) TcdB2-TccC3-Kristallen, die für 4 Stunden in Kristallisationspuffer I und 0.1 mM  $K_2Pt(NO_2)_4$  inkubierten. Die Datensätze beider Kristalle wurden an der Messstation/Strahllinie PXII-X10SA des Elektronenbeschleunigers SLS (Schweiz) aufgenommen. Die vergrößerten Ausschnitte (rechts) zeigen ein detailliertes Röntgenbeugungsmuster mit scharfen, runden und voneinander getrennten Reflexen in einem sauberen Kristallgitter.





**Abb. 56: Ausmaße der Einheitszelle in einem TcdB2-TccC3-Kristall**

(a) Front- und (b) Seitenansicht TcdB2TccC3-Einheitszelle (gelb gerahmt). Ein TcdB2-TccC3-Heterodimer (grün) bildet eine asymmetrische Einheit in der trigonalen Raumgruppe  $P3_221$ . Die TcdB2-TccC3-Symmetrieverwandten sind in braun dargestellt.



**Abb. 57: Experimentelle und verfeinerte Elektronendichtekarte eines TcdB2-TccC3-Kristalls**

Darstellung zweier Ausschnitte einer experimentell-phasiierten (rot) und verfeinerten  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarte (blau) eines TcdB2-TccC3-Heterodimers. Die Dichtekarten der oberen Reihe zeigen das Peptidrückgrat des TcdB2-TccC3-Kokons, die der unteren Reihe zeigen einen detaillierten Ausschnitt der Aminosäuren und deren Seitenketten dieses Bereiches. Alle Elektronendichtekarten wurden mit einem  $\sigma$  von 1,5 umrissen.

**Tab. 15: Kristallographische Zusammenfassung der Röntgenbeugungsexperimente Schwermetall-derivatisierter TcdB2-TccC3-Kristalle**

	TcdB2-TccC3					
	Thimerosal (EMTS)	K <sub>2</sub> Pt(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	Ethylendiamin- Iodoplatin(II)dimer Dinitrat (PIP)	Mersalylsäure	p-Chloro- quecksilberbenzen- sulfonsäure (PCMSB)
<b>Datenaufnahme</b>						
Raumgruppe	P3221	P3221	P3221	P3221	P3221	P3221
Einheitszelle						
<i>a, b, c</i> (Å)	232,36, 232,36, 143,57	232,59, 232,59, 142,90	232,93, 232,93, 143,19	232,29, 232,29, 143,23	232,35, 232,35, 143,28	232,63, 232,63, 143,49
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120
Wellenlänge (Å)	1,00717	1,07169	1,07169	1,07169	1,00717	1,00717
Auflösung (Å) *	30-2,35 (2,4-2,35)	30-3,25 (3,30-3,25)	30-3,05 (3,1-3,05)	30-2,9 (2,95-2,9)	30-2,9 (3,15-3,1)	30-2,55 (2,6-2,55)
<i>R</i> <sub>merge</sub> *	18,1 (11,1)	27,1 (145,6)	30,4 (181,6)	23,3 (115,2)	38,2 (175,5)	19,0 (143,9)
<i>I</i> / <i>s</i> *	17,62 (3,30)	12,39 (3,14)	13,25 (2,35)	15,04 (3,19)	9,72 (2,54)	13,48 (2,48)
Vollständigkeit (%) *	99,4 (90,5)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (99,9)	100 (100)
CC <sub>1/2</sub> (%) *	99,8 (82,7)	99,4 (84,7)	99,5 (84,3)	99,6 (87,6)	98,9 (79,4)	99,7 (80,2)
Redundanz *	19,3 (10,3)	10,5 (10,8)	21,1 (21,1)	21,1 (20,1)	10,4 (10,7)	11,1 (11,3)
<b>Datenverfeinerung</b>						
Auflösung (Å)	29,63-2,35					
Anzahl Reflexe	217656					
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	0,2064/0,2226					
Moleküle pro AU	1					
Anzahl Atome	18143					
Protein	16589					
Ligand / Ionen	9					
Wasser	1545					
Anzahl	2082					
Aminosäurereste	39,20					
B-Faktoren (Å <sup>2</sup> )	39,00					
Protein	87,70					
Ligand / Ionen	40,80					
Wasser						
RMS Abweichung						
Bond lengths (Å)	0,008					
Bond angles (°)	1,215					

**Tab. 16: Interaktionsfläche von TcdB2 mit TccC3 sowie des Kokons und  $\beta$ -Propellers von TcdB2**

Grenzfläche		Aminosäure-Reste		Lösemittel-zugängliche Fläche (Å <sup>2</sup> )		Wasserstoffbrücken	Salzbrücken	Freie Solvatationsenergie (kcal/mol)
<i>TcdB2-TccC3</i>		#1	#2	<i>Grenz-</i>	<i>Gesamt-</i>			
TcdB2	TccC3	119	106	3731	91687	47	6	-34.2
<i>TcdB2</i>		#1	#2	<i>Grenz-</i>	<i>Gesamt-</i>			
$\beta$ -Propeller	TcdB2	59	53	1734	64565	27	4	-9.7

```
>sp | P16916 | RhsA_ECOLI
MSGKPAARQGDMTQYGGSIIVQGSAGVRIGAPTGVACSVCPGGVTSGHPVNPILLGAKVLPGE
ETDIALPGPLPFILSRITYSSYRTKTPAPVGSGLPGWKMPADIRLQLRDNTLILSDNGGRS
LYFEHLFPGEDGYSRSESLWLVRRGGVAKLDEGHRLAALWQALPEELRLSPHRYLATNSPQ
GPWLLGWCERVPEADEVLPAPLPPYRVLTGLVDRFRGRTQTFHREAAGEFSGEITGVTDG
AWRHFRVLVLTQAQRAEEARQQAISSGGTEPSAFPDTLPGYTEYGRDNGIRLSAVWLTHDP
EYPENLPAAPLVRYGWTPRGELAVVYDRSGKQVRSFTYDDKYRGRMVVAHRHTGRPEIRYR
YDSGDRVTEQLNPAGLSYTYQYKDRITITDSDLRREVLHTQGEAGLKRVRVKEHADGSV
TQSQFDAVGRRLRAQTDAAGRTTEYS PDVVTGLITRITTPDGRASAFYNNHHNQLTSATGP
DGLELRREYDELGRLIQETAPDGDITRYRYDNPHSDLPCATEDATGSRKTMWTSRYGQLL
SFTDCSGYVTRYDHDRFGQMTAVHREEGLSQRAYDSRGQLIAVKDTQGHETRYEYNIAG
DLTAVIAPDGSRNQTQYDAWGKAVRTTQGGGLTRSMEDYAAGRVIIRLTSENGSHTTFRYDV
LDRLIQETGFDGRTRQRYHHDLTGKLIRSEDEGLVTHWHYDEADRLTHRTVKGETAERWQY
DERGWLTDISHISEGHRVAVHYRYDEKGRLTGERQTVHHPQTEALLWQHETRHAYNAOGL
ANRCIPDSLPAVEWLTYGSGYLAGMKLGDTPLVEYTRDRLHRETLRSFGRYELTTAYTPA
GQLQSQHLSLLSDRDYTWNDNGELIRISSPRQTRSYSYSTTGRLTGVTAAANLDIRIP
YATDPAGNRLPPELHPDSTLSMWPDNRIARDAHYLYRYDRHGRLTEKTDLIPEGVIRTD
DERTHRYHYDSQHRLVHYTRTQYEEPLVESRYLYDPLGRRVAKRVWRREDLTGWMSLSR
KPQVTWYGDGDRLLTIQNDRTRIQTIYQPGSFTPLIRVETATGELAKTQRRSLADALQQ
SGGEDGGSVVFPPVLVQMLDRLESEILADVSEESRRWLASCGLTVEQM QM QMDPVYTPA
RKIHLYHCDHRGLPLALISKEGTTWECAEYDEWGNLLNEENPHQLQQLIRLPGQQYDEES
GLYNNRHYYPLOGRYITQDPIGLKGGWNFYQYPLNPVTNTDPLGLEVFPRPFPLPIPW
PKSPAQQQADDNAAKALTKWVNDTASQRIFDSLILNPNGLALDITMIASRGNVADTGITD
RVNDIINDRFWSGKKPDRCDVLQELIDCGDISAKDAKSTQKAWNCRHSRQSNDDKKR
```

**Abb. 58: Vorkommen von klassischen YD-Repeats in RhsA aus *Escherichia coli***

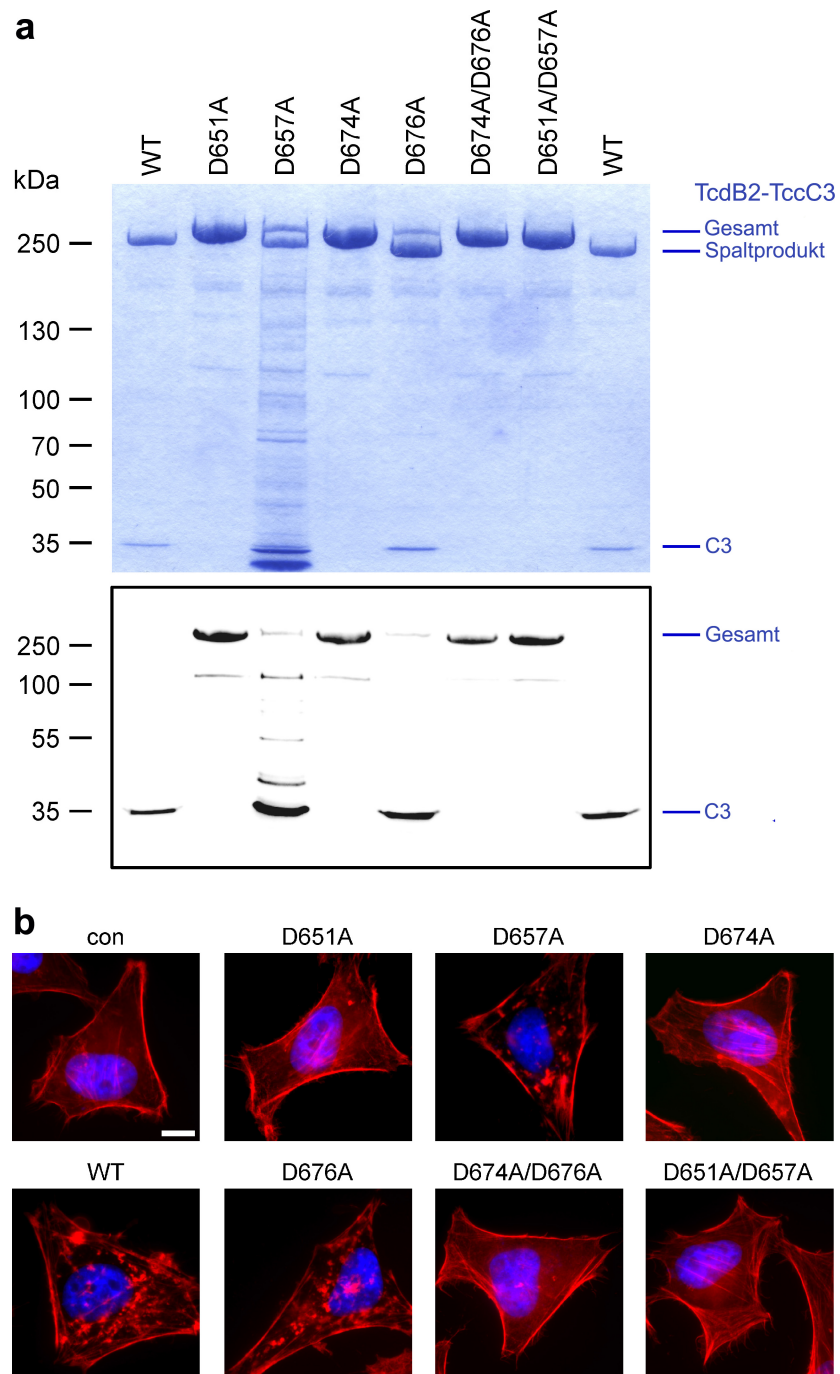
Die Aminosäuresequenz von RhsA aus *Escherichia coli* zeigt 18 klassische YD-Repeats (rot), die über die gesamte Sequenz verteilt sind.

```
>tr|Q8GF99|Q8GF99_PHOLU TcdB2
MQNSQDFSITELSLPKGGGAIITGMGEALTPTGPDGMAALSPLPISAGRGYAPAFITLNYN
SGAGNSPFGLGWDCNVMTIRRRTHFGVPHYDETDFTLGPEGEVLVVADQPRDESTLQGIN
LGATFTVTGYSRRLSHFSRLEYWQPKTTGKTDFWLIYSPDGQVHLLGKSPQARISNPSQ
TTQTAQWLLLEASVSSRGEQIYYQYRAEDDTGCEADEITHHLQATAQRYLHIVYYGNRTAS
ETLPLGLDGSAPSQADWLFYLVFDYGERSNNLKTTPAFSTTGSWLCRQDRFSRYEYGF EIR
TRRLCRQVLMYHHLQALDSKITEHNGPTLVSRILILNYDESIAASTLVFVRRVVGHEQDGNV
VTLPPLELAYQDFSPRHHAHQPMVDLANFNAIQRWQLVDLKGEGPLGLLYQDKGAWWYR
SAQRLGEIGSDAVTWEKMQPLSVIPSLQSNASLVDINGDGLDWVITGPGLRGYHSQRPD
GSWTRFTPLNALPVEYTHPRAQLADLMGAGLSLVLIGPKSVRLYANTRDGFAGKGDVVQ
SGDITLVPVPGADPRKLVAFSDVLGSGQAHLVEVSATKVTCWPNLGRGRFGQPIITLPGFSQ
PATEFNPAQVYLADLDGSGPTDLIYVHTNRLDIFLNKSGNGFAEPVTLRFPEGLRFDHTC
QLQMAADVQGLGVASLILSVPHMSPHHWRCDLTNMKPWLLNEMNNMGVHHTLRYSRSSQF
WLDEKAAALTTGQTPVCYLPFPPIHTLWQTETEDEISGNKLVTTLRARGAWDGREREFRG
FGYVEQTDHQLAQGNAPERTPPALTKNWAYATGLPVIDNALSTEYWRDDQAFAGFSRFT
TWQDNKDVPLTPEDDNSRYWFNRALKGQLLRSELYGLDDSTNKHVPYTVTEFRSQVRRLO
HTDSRYVPLWSSVVESRNYHYERIAADPQCSQONITLSSDRFGQPLKQLSVQYPRRQPAI
NLYPDTLPDKLLANSYDDQQRQLRLTYQSSWHHLTNNTVTVRVLGLPDSTRSDIFTYGAEN
VPAGGLNLELLSDKNSLIADDKPREYLGQOKTAYTDGQNTTLPQTPTRQALIAFTETTVF
NQSTLSAFNGSIPSDKLSTTLEQAGYQQTNYLFPRTGEDKVWVAHHGYTDYGTAAQFWRP
QKQSNQTLTGKITLIWDANYCVVVQTRDAAGLTTSKAYDWRFLTPVQLTDINDNQHLITL
DALGRPITLRFWGTENGKMTGYSSEKASFSPPSDVNAAIELKKPLPVAQCQVYAPESWM
PVLSQKTFNRLAEQDWQKLYNARIITEDGRICTLAYRRWVQSOKAIPQLISLLNNGPRLP
PHSLTTLTDRYDHDPEQQIRQVVFSDGFGRLQAAARHEAGMARQRNEDGSLIINVQHT
ENRWAVTGRTEYDNKGQPIRTYQPYFLNDWRYVSNDSARQEKEAYADTHVYDPIGREIKV
ITAKGWFRRTLFTPWFTVNEDENDTAAEVKKVKM
```

```
>tr|Q8GF97|Q8GF97_PHOLU TccC3
MKNIDPKLYQKTPTVSVYDNRGLIIRNIDFHRTTANGDPDTRITRHOYDIHGHLNQSIDP
RLYEAKQTNNTIKPNFLWQYDLTGPNLCTESIDAGRVTTLNDIEGRPLLTVTATGVIQTR
QYETSSLPGRLLSVAEQTPPEEKTSRITERLIWAGNTEAEKDHNLGQCVRHYDTAGVTRL
ESLSLTGTVLSQSSQLLIDTQEANWTGDNETVWQNM LADDIYTTLSTFDATGALLTQTD A
KGNIQRLAYDVAGQLNGSWLTLKGQTEQVIKSLTYSAAGQKLREEHGNDVITEYSYEPE
TQRLIGIKTRRPSDTKVLQDLRYEYDPVGNVISIRNDAEATRFWHNQKMPENTYTYDSL
YQLISATGREMANIGQOSHQFPSPALPSDNNTYTNYTRTYTYDRGGNLTKIQHSSPATQN
NYTTNITVSNRSNRAVLSTLTEDPAQVDALFDAGGHQNTLISGQNLNWNTRGELQQVTLV
KRDKGANDDREWYRYSYSGDGRMLKINEQQASNNAQTQRVTYLPNLELRLTQNSTATTEDL
QVITVGEAGRAQVRVLHWESGKPEDIDNNQLRYSYDNLIGSSQLELDSEGQIISEEEYYP
YGGTALWAARNQTEASYKTI RYSGKERDATGLYYYGYRYYPWIGRWLSSDPAGTIDGLN
LYRMVRNPNVTLDPDGLMPTTIAERIAALKKNKVTD SAPSPANATNVAINIRPPVAPKPS
LPKASTSSQPTTHPIGAANIKPTTSGSSIVAPLSPVGNKSTSEISLPESAQSSSSSTTST
NLQKKSFTLYRADNR... ADP-Ribosyltransferase C3 ... IFIGQKDTSNLPKETV
KNIISTWGAKPKLKDLSNYIKYTKDKSTVWVSTAINTEAGGQSSGAPLHKIDMDLYEFAID
GQKLNPLPEGRTKNMVPSLLLDTPQIETSSIIALNHGPVNDAEISFLTTPILKNVPHKR
```

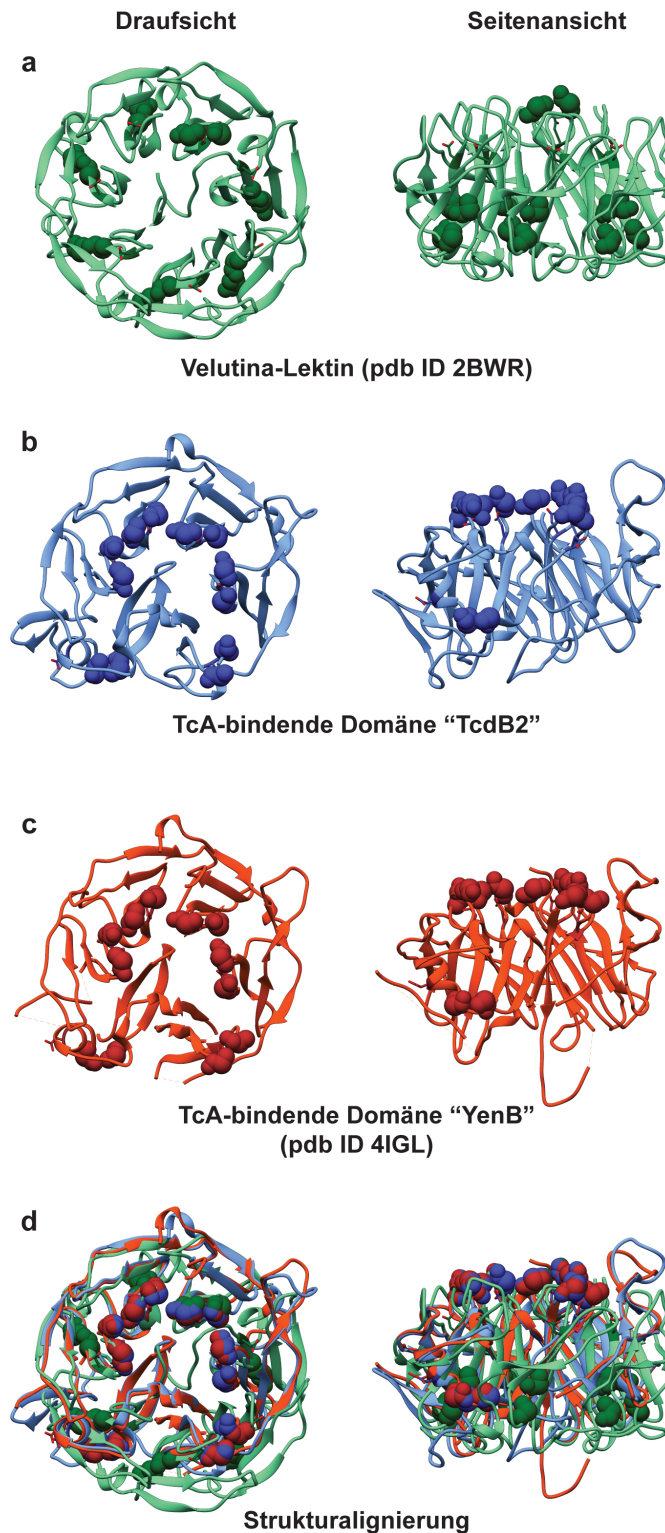
**Abb. 59: Vorkommen von klassischen und nicht-klassischen YD-Repeats in TcdB2 und TccC3 aus *Photobacterium luminescens***

Die Aminosäuresequenzen von TcdB2 bzw. TccC3 aus *Photobacterium luminescens* zeigen 3 bzw. 9 klassische (rot) und 19 bzw. 6 nicht-klassische (blau) YD-Repeats. Demnach treten in einem TcdB2-TccC3-Heterodimer insgesamt 37 YD-Repeats auf. Die Aminosäuresequenz der im C-Terminus von TccC3 sitzenden ADP-Ribosyltransferase C3 ist in hellgrau dargestellt.



**Abb. 60:** *in vitro* und *in vivo* Nachweis der intrinsischen Aspartatprotease-Aktivität im Kokoninnenraum des TcdB2-TccC3-Heterodimers

(a) Direkter *in vitro* Nachweis der intrinsischen Aspartatprotease-Aktivität in TcdB2-TccC3 wt sowie in den Einzel- und Doppelmутanten mittels SDS-PAGE-Analyse. (b) Indirekter fluoreszenzmikroskopischer *in vivo* Nachweis der ADP-Ribosyltransferase-Aktivität mittels Anfärbung von Aktinfilamenten. Abbildung wurde verändert nach Meusch et al., 2014.



**Abb. 61: Vergleich der TcA-bindenden Domäne mit homologen Strukturen**

(a) Das Lektin aus *Psathyrella velutina* (grün) zeigt sieben DxxGxG-Motive, wohingegen die TcA-bindende Domäne aus (b) TcdB2 (blau) und (c) YenB (rot) nur sechs Motive aufweisen. (d) Bei einer Alignierung der Strukturen fällt auf, dass die Motive der TcA-bindenden Domänen an identischen Stellen in den Strukturen zu finden sind. Die Motive des Lektins alignieren schlechter mit den Motiven der TcA-bindenden Domänen.

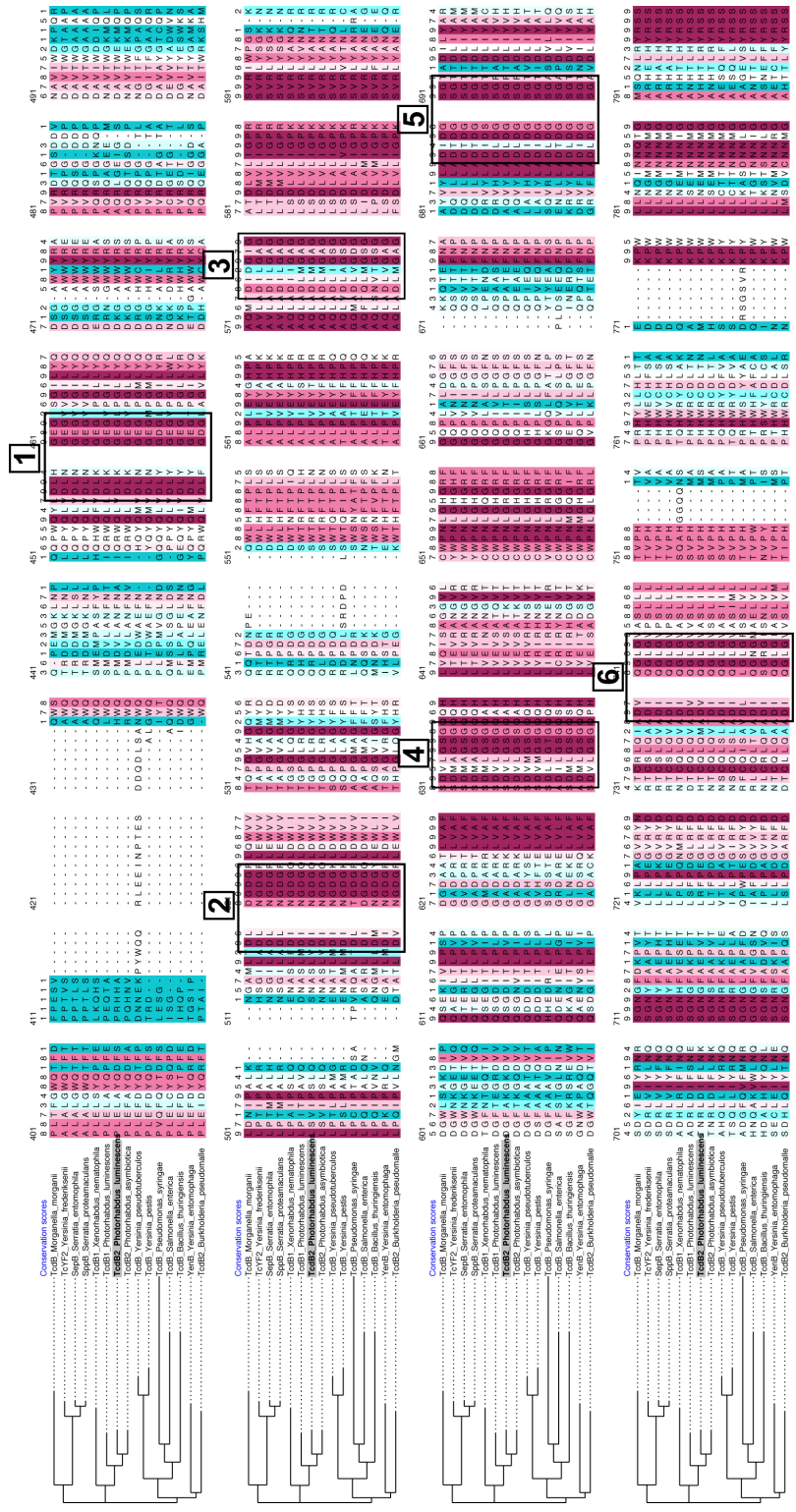
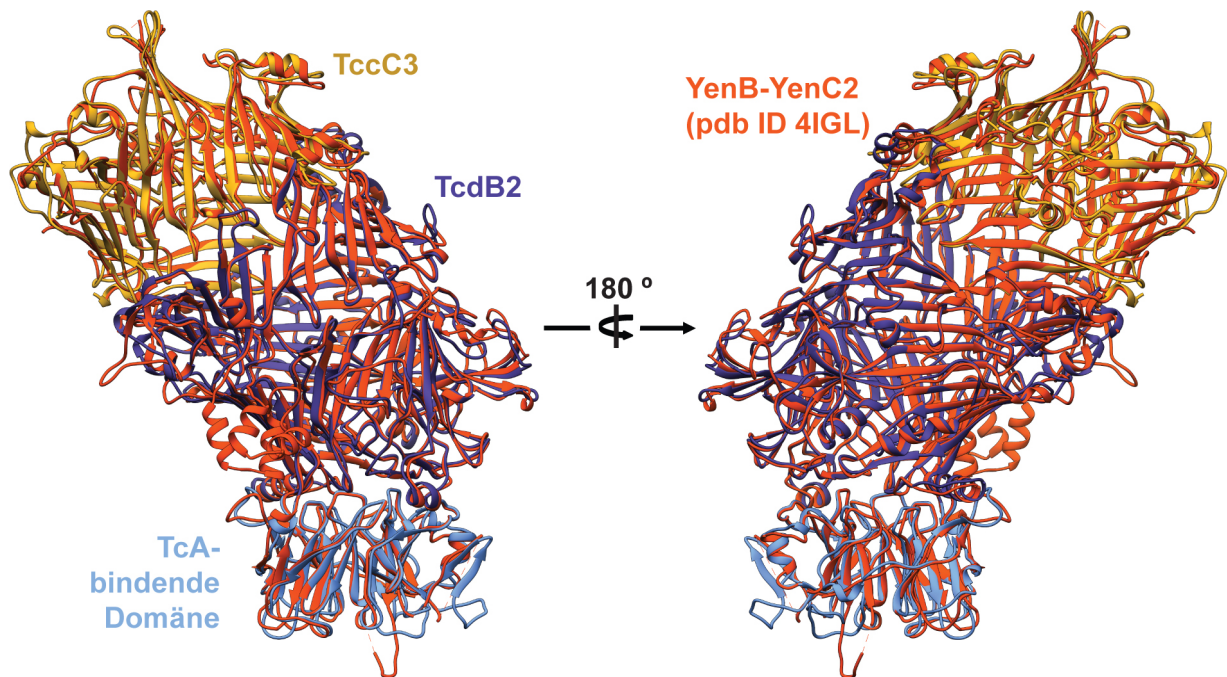


Abb. 62: Sequenzvergleich der TcA-bindenden Domäne aus TcdB2 mit Domänen homologer B-Komponenten

Der  $\beta$ -Propeller aus TcdB2 zeigt besonders in den sechs Bereichen der Glycinwiederholungen (nummeriert von 1 bis 6) eine hohe Konservierung zu homologen B-Komponenten verwandter Prokaryonten (0 % = blau, 100 % = rot). Die Aminosäuresequenz (AS 401 bis 800) des  $\beta$ -Propellers von TcdB2 aus *Photorhabdus luminescens* ist in grau hinterlegt.





**Abb. 63: Vergleich der TcdB2-TccC3-Struktur aus *P. luminescens* mit der YenB-YenC2-Struktur aus *Y. entomophaga***

Die Struktur von TcdB2-TccC3 (blau-gelb) aus *Photobacterium luminescens* zeigt bei Alignierung an die YenB-YenC2-Struktur (pdb Identifikationsnummer 4IGL) aus *Yersinia entomophaga* eine mittlere quadratische Standardabweichung (RMSD) von nur 0,77 Å, das auf eine sehr hohe Strukturhomologie hindeutet.

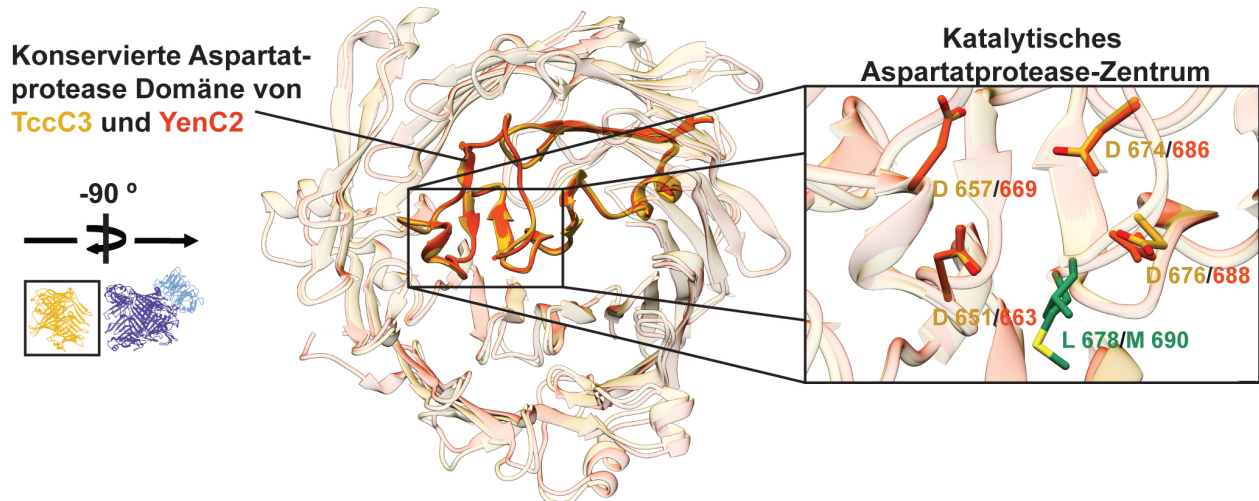


Abb. 64: Vergleich der RHS-Aspartatprotease-Domäne von TccC3 mit YenC2

Neben der hohen Sequenzhomologie der RHS-Aspartatprotease-Domänen aus verschiedenen Prokaryonten sind deren Strukturen (rechts) aus TccC3 (gelb) und YenC2 (rot) extrem homolog zueinander. Die beiden katalytisch-aktiven sowie zwei weitere konservierte Aspartate des katalytischen Zentrums (rechts) alignieren sehr gut mit einer geringen Standardabweichung.

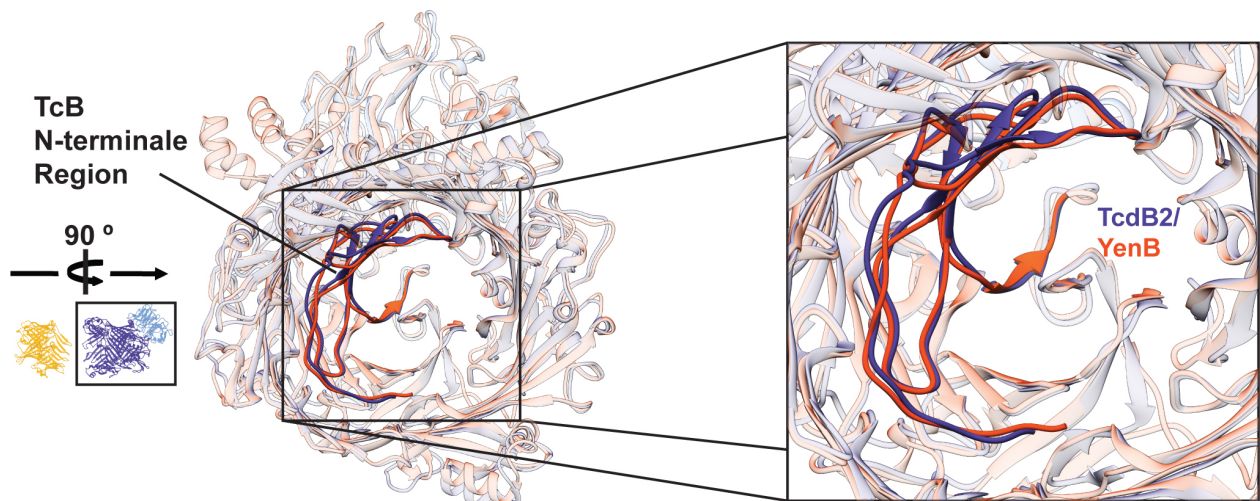
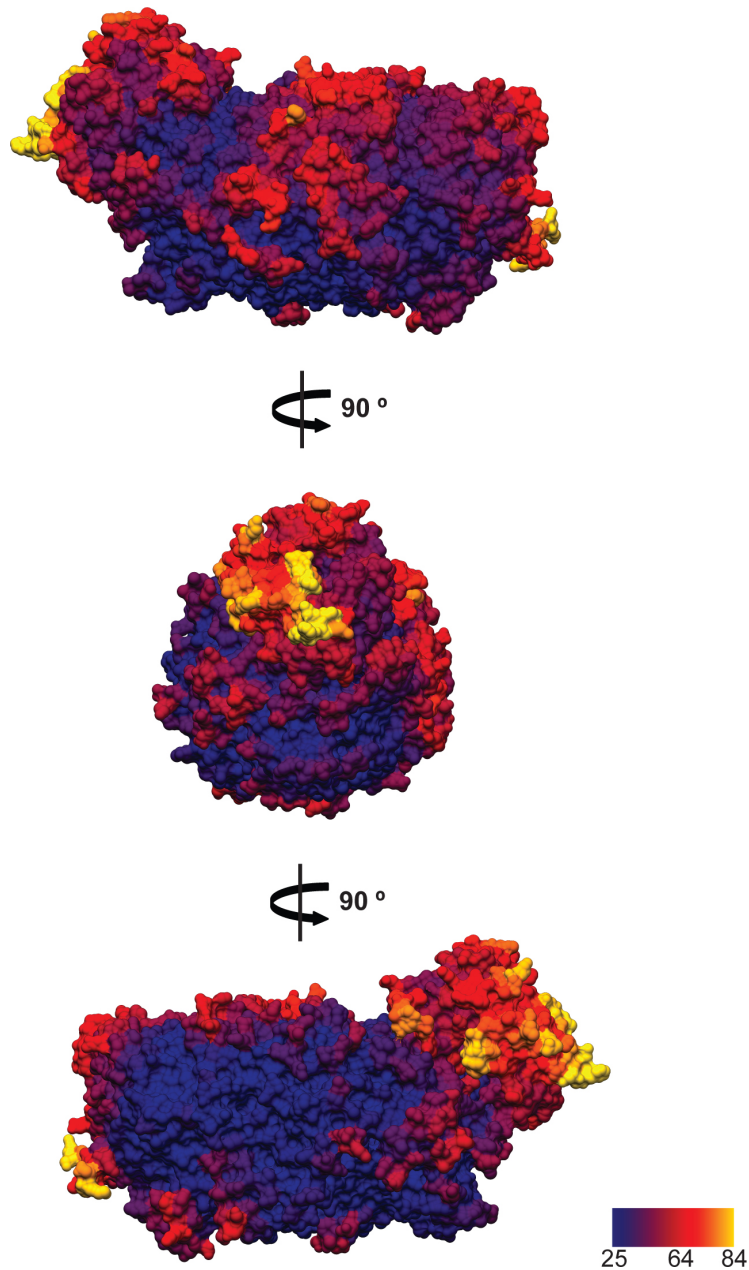


Abb. 65: Vergleich der TcB N-terminalen Region von TcdB2 mit YenB

Die TcB N-terminale Region von TcdB2 (blau) und YenB (rot) zeigen eine sehr ähnliche Faltung mit einer geringen Abweichung voneinander.







**Abb. 66: B-Faktorverteilung in einem TcdB2-TccC3-Heterodimer**

Die Aminosäurereste eines TcdB2-TccC3-Heterodimers sind anhand ihrer B-Faktorverteilung (Oberfläche in  $\text{\AA}^2$ ) eingefärbt. Dunkelblaue Bereiche zeigen niedrige B-Faktoren, wohingegen gelbe Bereiche hohe B-Faktoren andeuten.

**Tab. 17: Vorkommen von A-, B- und C-Komponenten in insekten-, pflanzen- und humanpathogenen Prokaryonten**

Das Vorkommen von A-, B- und C-Komponenten, die mögliche Aktivität des C-Terminus der jeweiligen C-Komponente sowie eine mögliche Chitinase-Aktivität im Tc-Toxin-Genlocus sind tabellarisch zusammengefasst.

Organismus	Anzahl von A-, B- oder C-Komponenten			Mögliche Aktivität des C-Terminus der C-Komponente	Mögliche Chitinase-Aktivität im Tc Toxin Genlocus	
	 #A	 #B	 #C		 Ja	Nein
<i>Insektenpathogene</i>						
<i>Photorhabdus luminescens</i>	5	3	7	ADP-Ribosyltransferase	✓	
<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	3	2	4	Zink-Metalloprotease	✓	
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	5	2	3	Dehydrogenase	✓	
<i>Xenorhabdus bovienii</i>	2	2	2	Dehydrogenase / Isomerase	✓	
<i>Yersinia entomophaga</i>	1	1	2	Desaminase / Cytotoxischer nekrotisierender Faktor (CNF)	✓	
<i>Serratia entomophila</i>	1	1	1	Adenylatzyklase		✓
<i>Serratia proteamaculans</i>	1	1	1	Phosphatase		✓
<i>Pseudomonas entomophila</i>	1	1	5	Oxidoreduktase		✓
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	1	2	Desaminase		✓
<i>Vibrio owensii</i>	1	1	2	Oxidoreduktase	✓	
<i>Paenibacillus alvei</i>	2	2	3	Desaminase		✓
<i>Pflanzenpathogene</i>						
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	1	1	Aldolase		✓
<i>Pseudomonas syringae</i>	1	1	6	Glykosyltransferase		✓
<i>Burkholderia rhizoxinica</i>	2	2	2	Zink-Metalloprotease		✓
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	1	1	1	ADP-Ribosyltransferase		✓
<i>Humanpathogene</i>						
<i>Yersinia frederiksenii</i>	1	1	1	ADP-Ribosyltransferase		✓
<i>Yersinia pestis</i>	1	1	2	Tyrosinphosphatase		✓
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	1	3	Adenylatzyklase / Tyrosinphosphatase		✓
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1	1	ADP-Ribosyltransferase		✓
<i>Yersinia mollaretii</i>	1	1	1	Zink-Metalloprotease		✓
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	2	3	4	Cysteinprotease / Rtx-Toxin		✓
<i>Morganella morganii</i>	2	2	4	Cytotoxischer nekrotisierender Faktor (CNF)		✓
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1	5	ADP-Ribosyltransferase		✓
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	1	Tyrosinphosphatase		✓
<i>Salmonella enterica</i>	2	2	4	ADP-Ribosyltransferase / Oxidoreduktase		✓
<i>Rahnella aquatilis</i>	2	2	3	Adenylatzyklase / Tyrosinphosphatase		✓

---

## 8 DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Raunser bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Er hat mir einen großen Freiraum für die selbstständige und eigenverantwortliche Durchführung meiner Doktorarbeit gegeben und stand mir bei schwierigen Fragestellungen während der gesamten Zeit mit Rat und Tat zur Seite.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Roger S. Goody für die Durchführung meiner Doktorarbeit in seiner Abteilung und für die freundliche Übernahme des Gutachtens dieser Doktorarbeit.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Roland Winter recht herzlich für seine freundliche Bereitschaft, ein Gutachten für meine Doktorarbeit zu erstellen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Aktories und Herrn Dr. Alexander Lang gilt ein großer Dank, da sie mir die Proteine für die Durchführung aller Experimente meiner Doktorarbeit zur Verfügung stellten.

Ich freue mich sehr, dass meine Arbeiten in Einklang mit den elektronenmikroskopischen Arbeiten meines Kollegen Dr. Christos Gatsogiannis standen und dass unsere Arbeiten sich trotz unterschiedlicher Techniken konsistent und harmonisch ergänzten. Für die tolle Zusammenarbeit danke ich ihm sehr.

Sandra Bergbrede, Anna Schäfer und Valentina Wagner gilt ein besonderer Dank, da sie mich in allen Fragestellungen des routinierten Laboralltags unterstützten und sie das Labor durchgehend betreuten.

Dr. Rouslan Efremov und Dr. Ingrid Vetter danke ich sehr für die Unterstützung bei allen kristallographischen Fragestellungen bezüglich der Strukturbestimmung und des Modellbaus von Proteinkomplexen.

Im Allgemeinen danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Raunser und der gesamten Abteilung für das freundliche und aufgeschlossene Arbeitsklima während der Zeit meiner Doktorarbeit.

Zum Schluss, aber nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer in meinem Leben unterstützten, und die ich dafür sehr liebe.

## 9 PUBLIKATIONEN & KONFERENZBEITRÄGE

### Publikationen:

Gatsogiannis, C., Lang, A.E., Meusch, D., Pfaumann, V., Hofnagel, O., Benz, R., Aktories, K., Raunser, S. (2013). A syringe-like injection mechanism in *Photobacterium luminescens* toxins. *Nature* **495** (7442),520-523.

Meusch, D., Gatsogiannis, C., Efremov, R.G., Lang, A.E., Hofnagel, O., Vetter, I.R., Aktories, K., Raunser, S. (2014). Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail. *Nature*. (akzeptiert)

### Konferenzbeiträge:

Meusch, D., Haering, C., Raunser, S. (2012). Integral transmembrane proteins involved in sterol and hopanoid transport. 47th Winter Seminar in Klosters, Schweiz.

Meusch, D., Gatsogiannis, C., Lang, A.E., Aktories, K., Raunser, S. (2012). Structure determination of a bacterial ABC toxin complex using X-ray crystallography. Konferenzvortrag & Posterpräsentation. SBBE 2012 - Structural Biology in the Bio Economy, Kapstadt, Südafrika.

Meusch, D., Gatsogiannis, C., Efremov, R.G., Lang, A.E., Hofnagel, O., Vetter, I.R., Aktories, K., Raunser, S. (2013). Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail. Posterpräsentation. Max-Planck Institut für molekulare Physiologie, Dortmund.