

## **Projekt 05: Funktionelle und strukturelle Charakterisierung putativer Substrate von Typ I Sekretionssystemen** (Betreuer: Lutz Schmitt)

**Hintergrund:** Typ I Sekretionssysteme (T1SS) sind in Gram-negativen Bakterien weit verbreitet und sekretieren eine Vielzahl von Proteinen, die über ein C-terminales Sekretionssignal verfügen. Im Allgemeinen bestehen T1SS aus einem ABC Transporter, einem Membranfusionsprotein und einem Protein der äußeren Membran. Die Komponenten sind zudem in einem Operon organisiert. Zusätzlich besitzen die meisten Substrate sogenannte Nonapeptid Wiederholungen (GG Wiederholungen), die  $Ca^{2+}$  im extrazellulären Medium binden und so die Faltung des Proteins induzieren. Diese Nonapeptid Wiederholungen bilden die RTX (repeats in toxins) Domäne aus. Daher werden diese Proteine auch als RTX Proteine bezeichnet. Das Musterbeispiel eines T1SS ist das Hämolyysin A (HlyA) T1SS. HlyA ist ein 1024 Aminosäuren langes RTX Protein, das in humanen Zielzellen Poren bildet. Nach erfolgreicher Sekretion aus dem Zytosol in das extrazelluläre Medium, faltet sich das Toxin durch die Bindung von  $Ca^{2+}$ , inseriert in die Plasmamembran der humanen Zielzelle und erzeugt Poren, die zum Zelltod führen.

**Vorarbeiten:** Basierend auf der Operonarchitektur und der Gegenwart der RTX Domäne haben wir bisher zehn mögliche RTX Proteine identifiziert. Für MbxA aus *Moraxella bovis* konnte wir die heterologe Expression und Sekretion durch das HlyA T1SS etablieren. Der  $LC_{50}$  Wert (Konzentration bei der 50% der Zielzellen sterben) für Epithel- und T-Zellen lag im niedrigen nanomolaren Bereich. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die Zelllyse innerhalb von Minuten durch die Bildung von Membranausstülpungen erfolgte.

**Ziele des Projektes:** Das Projekt soll den Oberflächenrezeptor des MbxA durch biochemische und zellbiologische Ansätze bestimmen. Zusätzlich soll die Möglichkeit des HlyA T1SS für eine heterologe Sekretion anderer RTX Proteine evaluiert werden. RTX Proteine die so identifiziert wurden sollen aufgereinigt und ihre dreidimensionale Struktur durch Röntgenstrukturanalyse oder Einzelpartikel cryo Elektronenmikroskopie (EM) bestimmt werden.

### **Arbeitsprogramm:**

- Sekretionsanalyse
- Identifikation der Zellrezeptoren
- Generation von Zelllinien mit Rezeptordeletionen
- Proteinaufreinigung
- Bestimmung der Proteinstruktur durch Röntgenstrukturanalyse und / oder Einzelpartikel cryo-EM