

# Kaz

<b>1. Uvod</b> .....	<b>2</b>
1.1 TA moduli.....	2
1.2 Vloga TA modulov.....	2
1.3 Modul ccdAB.....	4
1.3.1 Antitoksin CcdAVfi.....	4
1.3.2 Toksin CcdBVfi.....	5
1.3.3 Vežanje fragmenta CcdA37-72 na CcdB v E. Coli.....	5
1.3.4 DNA giraza.....	7
1.3.5 Vežanje CcdB na girazo v E. coli.....	8
1.4 Rejuvenation v E. coli.....	8
<b>2. Namen dela</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Eksperimentalni del</b> .....	<b>10</b>
3.1 Priprava pufrov in merjenje pH.....	10
3.2 Dializa vzorcev.....	10
3.3 Določanje koncentracij in ekstinkcijskih koeficientov.....	10
3.4 Metode.....	12
3.4.1 Cirkularni dikroizem (CD).....	12
3.4.2 Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC).....	14
3.5 Termodinamska analiza vežanja.....	17
3.5.1 Vežanje CcdA na CcdB.....	17
3.5.2 Vežanje CcdB na girazo.....	18
3.5.3 Splošna analiza vežanja.....	19
<b>5. Literatura</b> .....	<b>20</b>

# 1. U

## 1.1 TA moduli

TA oz. toksin-antitoksin moduli so operoni, ki vsebujejo dva gena in jih najdemo tako na plazmidih kot tudi na kromosomih<sup>[1]</sup>. Najprej so jih odkrili odkrili na „low copy number“ plazmidih in bakteriofagih, kjer naj bi delovali kot odvisnostni („addiction“) moduli<sup>[4] [1]</sup>. V letu 1993 sta bila na *E. coli* kromosomu odkrita dva homologa plazmidnih TA modulov in sicer *mazEF* in *chpBIK*, ki prav tako kot *ccdAB* iz F plazmida stabilizirata plazmide. Poznamo več družin TA modulov na kromosomih bakterij in arhej: *relBE*, *higBA*, *mazEF*, *ccdAB*, *vapBC*.<sup>[2]</sup>

Najbolj raziskani in opisani TA moduli imajo številne organizacijske in funkcijske podobnosti. Gena za toksin in antitoksin v vseh primerih ležita skupaj, gen za antitoksin leži pred genom za toksin, in se koekspresirata (istočasno izražata). Produkta genov sta kratkoživ antitoksin, velikosti 70-85 aminokislin, ki se veže na toksin in onemogoči njegovo delovanje, ter dolgoživ toksin, velikosti 100-130 aminokislin.<sup>[6]</sup> Antitoksin je tarča specifičnih proteaz kot so Lon, ClpXP ali ClpAP, medtem ko je toksin odporen na njihovo delovanje.<sup>[2]</sup>

Poznani sta dve tarči toksinov in sicer giraza kot tarča *ccd* in *parDE* modulov ter mRNA kot tarča *relBE*, *mazEF*, *higBA* in *yoeb/yefm* modulov.<sup>[1]</sup>

TA moduli so avtoregulirani na ravni transkripcije z kompleksom med toksinom in antitoksinom ali samim antitoksinom.<sup>[6]</sup>

## 1.2 Vloga TA modulov

Vloga TA modulov je predmet številnih razprav. Najprej so bili označeni kot stabilizirajoči faktorji na plazmidih, ki imajo nizko število kopij („low copy number“), saj so omogočali dedovanje plazmida in s tem genov potrebnih za lastno izražanje.<sup>[2]</sup> Ob celični delitvi namreč obe hčerinski celici podedujeta nekaj toksin-antitoksin kompleksov iz citoplazme. Če hčerinska celica ne podeduje kopije plazmida, sinteza dodatnih antitoksinov ni možna. Sčasoma se obstoječi antitoksin razgradi, toksin pa sprosti, se veže na tarčo in povzroči celično smrt.<sup>[1]</sup>

Druga izmed hipotez predpostavlja, da gre za module, ki inducirajo „nesebično smrt“ nekaterih celic. Aktivirajo se namreč pod ekstremnim stresom: aminokislinsko stradanje, timinsko stradanje, poškodbe druge DNA, prisotnost antibiotikov ali prisotnost fagov. Z delovanjem lahko tako preprečijo širitev okužbe fagov, ščitijo bakterijski kromosom ali pa ob hranilnem stresu omogočijo, da ostale celice dobijo več hranilnih snovi. Ta hipoteza pa je v nasprotju z Darwinovo evolucijsko teorijo, saj bi sčasoma mutanti, ki imajo TA module deaktivirane, prevladali in izločili celice z aktivnimi TA moduli.<sup>[2]</sup>

Najbolj razširjena ideja je, da TA toksini ne pobijajo celic ampak inducirajo reverzibilni zastoj metabolizma. To omogoča celicam, da preživijo serijo ekstremnega hranilnega stresa. Ko se pogoji izboljšajo, se vsaj en del celic uspe obnoviti in nadaljevati normalno celično delovanje. To hipotezo potrjuje odpornost bakterij v biofilmih na antibiotike. Aktivnost TA modulov lahko namreč ustavi metabolizem in antibiotiki, ki delujejo na principu metabolizma ali rasti, ne morejo delovati. <sup>[2]</sup>

Splošno shemo delovanja TA modulov lahko vidite na sliki 1.2.1

**Slika 1.2.1:** Splošna shema delovanja TA modulov. Antitoksin je označen z zeleno, toksin z rdečo barvo. Deaktiviran kompleks toksin-antitoksin, se ne more vezati na tarčo (girazo, označeno z modro), medtem ko se prost toksin lahko. Ob vezavi se giraza deaktivira, reaktivacija je možna v procesu poimenovanem rejuvation, kjer se antitoksin veže na toksin vezan na girazo in ga sprosti iz tarče.

## 1.3 Modul *ccdAB*

*CcdAB* TA modul so odkrili pred okrog 30 let in je hkrati tudi prvi odkrit TA modul.<sup>[2]</sup> Nahaja se na F plazmidu bakterije *E. coli* in kodira antitoksin *CcdA<sub>F</sub>*, ter toksin *CcdB<sub>F</sub>*. Tarča toksina je A podenota DNA giraze.<sup>[1]</sup> Antitoksin neprestano razgrajuje Lon proteaza.<sup>[4]</sup> *Ccd* družina TA modulov pa vsebuje tudi številne kromosomske homologe, med drugim tudi *CcdAB* TA modul, ki se nahaja na **integronu** kromosoma bakterije *Vibrio fischeri*.<sup>[1]</sup>

### 1.3.1 Antitoksin *CcdA<sub>Vfi</sub>*

*CcdA* iz *Vibrio fischeri* kaže 22% sekvenčno podobnost s *CcdA<sub>F</sub>* iz F plazmida v *E. coli*.<sup>[1]</sup> Sestavljen je iz dveh domen. N-terminalna regija ima variabilno zvitje in služi vezavi na DNA, medtem ko je C-terminalna regija nestrukturirana – intrinzično neurejena in služi vezavi na toksin *CcdB*.<sup>[2][5]</sup> V eksperimentih smo uporabili le C-terminalni del proteina *CcdA*, saj je bolj topen, ker nosi večji neto naboj.

**Slika 1.3.1.1:** Teoretičen model strukture *CcdA* iz bakterije *Vibrio fischeri*. Na sliki sta lepo razvidna nestrukturiran C-konec in zvit N-konec. V eksperimentih smo uporabljali le zeleno označen fragment proteina.

Struktura je dostopna na spletu: ključna beseda Q84B81.

Posledica neurejenega C-konca je velika občutljivost *CcdA* na proteolitično razgradnjo s proteazo Lon in tako tudi kratka življenjska doba. Zaradi kratke življenjske dobe, je tudi odziv TA sistema na spremembe v okolju, hiter<sup>[5]</sup>

Ko je antitoksin vezan na toksin, privzame C-konec razširjeno konformacijo.<sup>[2]</sup>

[SLIKA *CcdB:CcdA* kompleksa]

### 1.3.2 Toksin CcdB<sub>Vfi</sub>

CcdB iz *Vibrio fischeri* kaže 41% sekvenčno podobnost s CcdB<sub>F</sub> iz F plazmida v *E. Coli*. Gre za dobro strukturiran protein, ki je v raztopini dimer. Glavnino monomerne enote predstavljajo  $\beta$ -ploskve, razdeljene v skupino po pet trakov na N-terminalnem delu in manjšo skupino s tremi trakovi. Na C-terminalnem delu se nahaja  $\alpha$ -vijačnica.<sup>[4]</sup>

**Slika 1.3.2.1:** Struktura CcdB iz bakterije *Vibrio fischeri*. Na C-terminalnem delu se nahaja  $\alpha$ -vijačnica, medtem ko ostali del molekule predstavljajo  $\beta$ -ploskve. S črtkano črto je prikazana slabo definirana regija med Leu46 in Pro56. Struktura je dostopna na spletu: ključna beseda 3jsc.

CcdB<sub>F</sub> iz F plazmida ima ločen naboj na površini, saj so  $\beta$ -ploskve sestavljene večidel iz argininov in lizinov, ki so pozitivno nabiti, medtem ko je  $\alpha$ -vijačnica negativno nabita. Takšna ločitev naboja naj bi predstavljala vlogo pri interakcijah z girazo in DNA substratom vezanim na girazo. CcdB<sub>Vfi</sub> po drugi strani take ločitve naboja ne kaže, saj skupki argininov in lizinov, ki so prisotni v CcdB<sub>F</sub> tukaj niso ohranjeni.<sup>[4]</sup>

CcdB<sub>Vfi</sub> tvori dimer, tako da se monomera stikata preko velike hidrofobne površine - hidrofobnega jedra. Preko primerjave kristalnih struktur je bilo ugotovljeno, da dimer ni toga struktura. Pri termični denaturaciji se v monomerno obliko razvije v dvostopenjskem ravnotežnem procesu. Največjo stabilnost kaže pri pH okrog 7, stabilen pa je še do pH = 11. Pri pH 4.0 (pod pI) pa je prehod ireverzibilen. V toplotno denaturiranem stanju CcdB<sub>Vfi</sub> ni v celoti razvit.<sup>[4]</sup>

### 1.3.3 Vezanje fragmenta CcdA<sup>37-72</sup> na CcdB v *E. Coli*

Ob vezavi na visoko afinitetno mesto na dimeru CcdB (CcdB<sub>2</sub>), se prej monomeren in intrinzično neurejen fragment proteina CcdA (CcdA<sup>37-72</sup>) zvije tako, da tvori enotno  $\alpha$ -vijačnico. Površina na CcdB<sub>2</sub> s katero fragment CcdA<sup>37-72</sup> interagira, je večinoma hidrofobna. Z vezavo CcdA<sup>37-72</sup> v CcdB<sub>2</sub> pride do spremembe kvartarne strukture. Na CcdB<sub>2</sub> se na mesto z nižjo afiniteto lahko veže še dodaten fragment CcdA<sup>37-72</sup> in tako tvori kompleks CcdA<sup>37-72</sup><sub>2</sub>:CcdB<sub>2</sub>. Preko dveh vezavnih mest na CcdB<sub>2</sub> se lahko tako tvori linearni alternirajoči polimer (CcdA<sup>37-72</sup><sub>2</sub>:CcdB<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, ki se obnaša kot represorski kompleks *ccdAB* operona in tako omogoča avtoregulacijo transkripcije.<sup>[5]</sup>

Afiniteta CcdA do svoje **operatorske** DNA je modulirana z razmerjem med CcdA in CcdB. Oba CcdA<sub>2</sub> in CcdB<sub>2</sub> imata dve vezavni mesti za drug drugega, kar omogoča tvorbo kompleksov z

različnimi stehiometrijami. Največja represija, ki se lahko doseže je pri razmerju CcdA:CcdB 1:1 - že zgoraj omenjena veriga alternirajočih CcdA<sub>2</sub> in CcdB<sub>2</sub> dimerov. Pri višjih razmerjih, CcdB deluje kot antirepresor raje kot korepresor in tvori topen heksameren CcdA<sub>2</sub>:CcdB<sub>4</sub> kompleks.<sup>[5]</sup>

### 1.3.4 DNA giraza

Tarča CcdB je A podenota DNA giraze, esencialne bakterijske topoizomeraze, ki lahko v DNA povzroči negativno superzvitje na račun energije iz ATP. Ta encim omogoča tudi relaksacijo pozitivnih superzvitij pred replikacijskimi vilicami in tako omogoča nadaljevanje replikacije. <sup>[5][1]</sup>  
[2]

Sekvence podenot giraze so zelo ohranjene, saj je giraza esencialni encim. Podenota GyrA iz bakterije *E. Coli* in podenota GyrA iz bakterije *V. Fischeri* kažeta 76% sekvenčno podobnost. Substitucij na mestu, kjer prihaja do vezave CcdB je zelo malo. <sup>[4]</sup>

Giraza je heterotetramer, ki je sestavljen iz dveh GyrA podenot in dveh GyrB podenot. GyrA podenota skrbi za intrinzično DNA superzvitje/relaksacijo, GyrB pa omogoča hidrolizo ATP, ki je potrebna za nekatere, ne pa vse, reakcije v katerih sodeluje giraza. <sup>[5]</sup>

59 kDa velik N-terminalni del GyrA (GyrA59) vsebuje tirozine v aktivnem mestu ki so potrebni za „breakage“ DNA in religacijo („religation“). Med vsakim ciklom prehoda verige DNA, gre dimer GyrA59<sub>2</sub> skozi vrsto konformacij. Ena izmed njih je odprta konformacija, ki jo prepozna CcdB<sub>2</sub> dimer. Vezava CcdB<sub>2</sub> na GyrA59<sub>2</sub> prepreči prehod verige DNA, onemogoči pa tudi zaprtje giraze. CcdB lahko inhibira tako prosto girazo kot tudi intermediate DNA:giraza, kjer ustvari oviro za polimeraze. <sup>[5]</sup>

**Slika 1.3.4.1:** Teoretičen model fragmenta giraze (GyrA59) iz bakterije *Vibrio fischeri*. Z modro je označen fragment GyrA14, z vijolično pa preostanek fragmenta. Struktura je prosto dostopna na spletu, ključna beseda Q5E5J7

Poznana je kristalna struktura kompleksa med CcdB<sub>EC</sub> in fragmentom giraze (GyrA14) iz bakterije *E. coli*. Iz te strukture je razvidno, da obstaja pomembna interakcija med Trp99 CcdB in Arg462 giraze. Ključno vlogo Trp99 v interakciji z girazo so potrdili tudi s mestno specifično mutagenozo. Pri CcdB iz bakterije *Vibrio fischeri* pa esencialni Trp99 ni ohranjen, pač pa je zamenjan z Thr103. Ključno mesto na girazi pa je Arg462 in je ohranjeno. Še vedno je nejasno kako lahko Thr103 zamenja Trp99.

**Slika 1.3.4.2:** Struktura dimera CcdB iz bakterije *Vibrio fischeri* na dimeru fragmentu giraze (GyrA14) iz bakterije *Vibrio fischeri*. Z modro/svetlo modro je označen dimerni fragment giraze, z rdečo/oranžno dimer CcdB. Ključni mesti na girazi (Arg462), sta označeni z rumeno, ključni mesti na CcdB (Thr103) pa sta označeni z zeleno barvo.

**Slika 1.3.4.3:** shema, ki ponazarja kako kompleks CcdB:giraza zaustavi delovanje DNA ali RNA polimeraze tako da ustvari oviro. Z modro (GyrA14) in vijolično sta označena fragmenta GyrA59, z rumeno fragment GyrB. CcdB je rdeč, DNA pa črne barve.

### **1.3.5 Vezanje CcdB na girazo v *E. coli***

Vežanje CcdB<sub>Ecoli</sub> na girazo je entalpijsko voden proces, ki ga vodijo specifične interakcije med CcdB in visoko stabilno dimerizacijsko domeno GyrA. Prepoznavanje CcdB-Giraza je spremljano z odprtjem stolpa in katalitične domene GyrA. Takšne strukturne spremembe pa so kritične sile, ki vodijo proces. Kristalna struktura CcdB vezanega na dimerizacijsko domeno GyrA podenote giraze predlaga, da se lahko CcdB veže le na odprto konformacijo GyrA. Vežanje CcdB na GyrA59 *E.coli* v raztopini ni mogoče neposredno spremljati, ker je odprtje stolpa in katalitičnih domen najverjetneje kinetično omejeno.<sup>[3]</sup>

## **1.4 Rejuvenation v *E. coli***

Rejuvenation je proces v katerem se kovalentni adukti med CcdB in fragmentom giraze, GyrA, sprostijo in giraza se povrne k prvotni aktivnosti.<sup>[2]</sup> Predlagan mehanizem je alosteričen. Z GyrA59 interagira del CcdB, ki je odgovoren za vezavo N-terminalnega dela CcdA, medtem ko ostaja mesto namenjeno vezavi C-terminalnega dela CcdA prosto.<sup>[5]</sup>

Najprej se na nizko afinitetno mesto CcdB<sub>2</sub> vezanega v kompleks z GyrA59<sub>2</sub>, veže C-terminalni del CcdA. Sledi disociacija CcdB<sub>2</sub>:GyrA59<sub>2</sub> kompleksa ter vezava dodatnega fragmenta CcdA na drugo visoko afinitetno mesto. Nastane stabilen CcdA<sub>2</sub>:CcdB<sub>2</sub> kompleks.<sup>[5]</sup>



## 2. Na m e n d e l a

TA moduli so zanimivi tako s stališča razumevanja kot tudi stališča načrtovanja novih antibiotikov. Razlog za njihovo prisotnost v celicah je še vedno predmet številnih razprav in ugibanj, ne razumemo pa niti molekulskih osnov njihovega delovanja. Razumevanje mehanizma delovanja TA modula zahteva informacije o interakcijah, ki določajo prostorsko strukturo (stabilnost) udeleženih molekul in njihovo vezanje.

Da bi bolje razumeli mehanizem delovanja modula *CcdAB* iz *Vibrio fischeri*, je bil naš osnovni namen raziskati termodinamiko vezanja antitoksina CcdA in toksina CcdB. Zaradi težav s topnostjo in zaradi enotnosti analize eksperimentalnih podatkov, smo sistem poenostavili.

Opazovali smo vezanje nestrukturiranega dela CcdA. Dobljene podatke smo skušali interpretirati s pomočjo dostopnih strukturnih informacij. Da bi raziskali vpletenost vezave CcdA v mehanizem delovanja modula *CcdAB* smo raziskali vezanje antitoksina CcdA, toksina CcdB in njegove celične tarče DNA giraze:

**Slika 2.0.1:** Shema vezanja možnih kompleksov med Girazo in CcdB ter CcdB in CcdA

Za termodinamski opis predpostavljenih stopenj, smo kombinirali informacije dobljene s pomočjo raziskave vezanja CcdA na CcdB in CcdB na GyrA59. Informacije smo dobili s pomočjo modelske analize kalorimetričnih titracij.

Če bo termodinamska študija o mehanizmu delovanja CcdA uspešna, bo prispevala pomemben del k razumevanju delovanja modula *CcdAB* iz *Vibrio fischeri*.

# 3. Eksp d e l

## 3.1 Priprava pufrov in merjenje pH

Pripravljaj sem:

- 2x TRIS pufer, ki je bil 0,04 M glede na vsebnost TRIS, 0,30 M glede na vsebnost NaCl in 0,002 M glede na vsebnost EDTA
- 2x fosfatni pufer, ki je bil 0,02 M glede na vsebnost  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,02 M glede na vsebnost  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,30 M glede na vsebnost NaCl in 0,002 M glede na vsebnost EDTA
- 2x MOPS pufer, ki je bil 0,04 M glede na vsebnost MOPS, 0,30 M glede na vsebnost NaCl in 0,002 M glede na vsebnost EDTA

Pufer sem vselej pripravil tako, da sem v čašo zatehtal potrebne količine soli, dodal 800 mL 3x destilirane vode ter med mešanjem naravnal pH na 7,5 s pomočjo 4 M HCl. V primeru MOPS pufra, sem pH naravnal s pomočjo 6,6 M NaOH. Pri tem sem si pomagal s pH metrom (vstavi ime tukaj), ki sem ga pred merjenjem uravnal s fosfatnim pufrom, ki ima  $\text{pH} = 6,865$  pri  $25^\circ\text{C}$ . Vsebino sem nato prelil v bučko in dopolnil do oznake, dobro premešal ter shranil v hladilniku do uporabe.

## 3.2 Dializa vzorcev

Raztopine sem pred ITC eksperimentom dializiral 24 ur. In sicer sem CcdB, GyrA59 in GyrA14 dializiral v 3,500 MWCO membranah Slide-A-Lyzer, CcdA pa v 100-500 MWCO dializnih črevesih Spectra/Por Float-A-Lyzer G2. Pufer sem menjal po eni uri, po treh urah in nato pustil čez noč. Raztopine sem po končani dializi prefiltriral skozi filter Minisart RC4 z velikostjo por  $0,45 \mu\text{m}$ .

## 3.3 Določanje koncentracij in ekstinkcijskih koeficientov

Koncentracije sem določal preko merjenja absorbanc pri 280 nm in  $25^\circ\text{C}$ . Iz izmerjene absorbance sem preko Beer-Lambertovega zakona  $A = \epsilon * c * l$ , kjer  $\epsilon$  predstavlja ekstinkcijski koeficient v  $\text{cm}^{-1}$

1

$\text{M}^{-1}$ ,  $c$  koncentracijo raztopine v  $\text{M}$

1

in  $l$  dolžino optične poti v cm, določil koncentracije. Pri tem sem uporabil ekstinkcijske koeficiente, ki sem jih določil s pomočjo denaturacije proteinov v 6 M  $\text{GdmHCl}$ .

To sem storil tako, da sem izmeril absorbanco raztopine z nativno obliko proteina in

absorbanco raztopine s proteinom denaturiranim z 6M gdmHCl. Iz poznavanja primarne strukture sem nato določil ekstinkcijski koeficient denaturiranega proteina po enačbi<sup>[7]</sup>:

$$\epsilon_{280nm}^{25^\circ C} = 5685 * (\text{št. triptofanov}) + 1285 * (\text{št. tirozinov}) + 125 * (\text{št. cisteinov}) \quad (3.3.1)$$

Ekstinkcijski koeficient nativne oblike sem nato dobil po enačbi:

$$\epsilon_{NAT} = \frac{\epsilon_{gdmHCl} * A_{NAT}}{A_{gdmHCl}} \quad (3.3.2)$$

Proučevani proteini imajo sledeče primarne strukture, ekstinkcijske koeficiente in molske mase:

### GyrA59

MSDLAKEITPVNIEDELRSYLDYAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLFAMDVLGNDWNKPYKKSARVVG  
 DVIGKYHPHGDSAVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAMRYTEVRMAKIAHELLADLDKET  
 VDYPVNYDGTEQIPAVLPTKIPNLLVNGSSGIAVGMATNIPPHNLTEVVNGCLAFIENEETIDELMNYIPGPDFP  
 TAALISGRKGIVDAYKTGRGKVMRSKANIEADKNGKETIIVTEIPYQVVKARLIEKIAELVKDKKVEGISALRDE  
 SDKDGMRIEICKRDAVGEVVLNNLYSLTQLQTTFGINMVALDNGQPKLFNLKEMLKCFVDHRREVV**TRRTI**  
**FELRKARDRAHILEGLALALANIDEIIELIKNAPTPAEAKEGLISRGWDLGNVASMLERAGTDAAR**  
**PDWLEPEFGIREGKYFLTEQQAQAILELRLHRLTGLEHEKILDEYKALLDEIAELMHILAS**TERLMEV  
 IRDELVMVRDMYGDERRTEIGAA

Opomba: S krepko je označen fragment GyrA14

$$M = 58708,4 \frac{g}{mol} / dimer$$

$$\epsilon_{280nm}^{25^\circ C} = 41830 M^{-1} cm^{-1} / dimer$$

### GyrA14

TRRTIFELRKARDRAHILEGLALALANIDEIIELIKNAPTPAEAKEGLISRGWDLGNVASMLERAGTDAARPDWL  
 EPEFGIREGKYFLTEQQAQAILELRLHRLTGLEHEKLLDEYKALLDEIAELMHILAS

$$M = 14938,1 \frac{g}{mol} / dimer$$

$$\epsilon_{280nm}^{25^\circ C} = 13980 M^{-1} cm^{-1} / dimer$$

### fragment CcdA

SKLKRQEWLEQNSEIDACNELTDKYGLFSDSYRVF

$$M = 4284,7 \frac{g}{mol} / monomer$$

$$\epsilon_{280nm}^{25^\circ C} = 7090 M^{-1} cm^{-1} / monomer$$

### CcdB

MSQFTLYKNKDKSSAKTYPFVDVQSDLLDNLNTRLVIPLTPIELLDKKAPSHLCPTIHIDEGDFIMLTQQMTSV

PVKILSEPVNELSTFRNEIAAIDFLITGI

$$M = 11868,7 \frac{g}{mol} / dimer$$

$$\epsilon_{280nm}^{25^\circ C} = 4548 M^{-1}cm^{-1} / dimer$$

## 5. Li a

1. De Jonge, N., Buts, L., Vangelooven, L., Mine, N., Van Melderen, L., Wyns, L., Loris, R. (2007). Purification and crystallization of *Vibrio fischeri* CcdB and its complexes with fragments of gyrase and CcdA. *Acta Cryst.* 356-360
2. Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M., Wyns, L., Loris, R., (2005). Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers, *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 30 no. 12
3. Simic, M., De Jonge, N., Loris, R., Vesnaver, G., Lah, J., (2009). Driving Forces of Gyrase recognition by the Addiction Toxin CcdB, *The Journal of Biological Chemistry*, 20002-20010
4. De Jonge, N., Hohlweg, W., Garcia-Pino, A., Respondek, M., Buts, L., Haesaerts, S., Lah, J., Zangger, K., Loris, R., (2009). Structural and thermodynamic characterization of *Vibrio fischeri* CcdB, *Journal of Biological Chemistry*, M109.068429
5. De Jonge, N., Garcia-Pino, A., Buts, L., Haesaerts, S., Charlier, D., Zangger, K., Wyns, L., De Greve, H., Loris, R., (2009). Rejuvenation of CcdB-Poisoned Gyrase by an Intrinsically Disordered Protein Domain, *Molecular Cell*, 35:154-163
6. Engelberg-Kulka, H., Glaser, G., (1999). Addiction modules and Programmed Cell Death and Antideath in Bacterial Cultures, *Annu. Rev. Microbiol.* 53:43-70
7. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T., (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.*, 4: 2411-2423
- 8.