

Dissertation

**Struktur-Funktionsanalyse des
periplasmatischen Chaperons SurA aus
*Escherichia coli***

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

Dipl. Biol. Yvonne Werstler, geb. Matern

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät:

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/in: 1. PD Dr. Klaus Heuner

2. Dr. habil. Susanne Behrens-Kneip

3. Prof. Dr. Erwin Schneider

4. Prof. Dr. Michael Ehrmann

Datum der Einreichung: 18. April 2014

Datum der Promotion: 08. September 2015

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung.....	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Die Zellhülle des Gram-negativen Bakteriums <i>Escherichia coli</i>	5
1.2 Faltungswege der OMPs im Periplasma	7
1.3 Periplasmatische Faltungshelfer	9
1.3.1 Periplasmatische Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen).....	9
1.3.2 Disulfidbrücken-Isomerasen.....	11
1.3.3 Die periplasmatische Protease DegP.....	11
1.3.4 Das periplasmatische Chaperon Skp	12
1.4 Einbau der OMPs in die äußere Membran durch den BAM-Komplex.....	12
1.5 Das periplasmatische Chaperon SurA	13
1.6 Einfluss von SurA auf die Pathogenese von <i>E. coli</i>	17
1.7 Problemstellung und Einleitung in die Versuche.....	18
2 Material	20
2.1 Bakterienstämme	20
2.2 Vektoren	20
2.3 Peptide.....	22
2.4 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker.....	22
2.4.1 DNA-Längenstandards.....	22
2.4.2 Molekulargewichtsmarker für Proteine	22
2.5 Oligodesoxyribonukleotide.....	23
2.5.1 Oligodesoxyribonukleotide für die Amplifikation mittels PCR.....	23
2.5.2 Oligodesoxyribonukleotide für die Sequenzierung	23
2.5.3 Oligodesoxyribonukleotide für die Mutagenese	23
2.6 Chemikalien.....	25
2.7 Antikörper	26
2.8 Enzyme	27
2.9 Verwendete Kits	27
2.10 Sonstige Materialien und Geräte.....	27
2.11 Nährmedien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i> (Vollmedien)	28
2.12 Lösungen und Puffer.....	28
2.13 Verwendete Software.....	33
3 Methoden	34
3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	34

INHALTSVERZEICHNIS

3.1.1 Stammhaltung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> -Zellen	34
3.1.2 Vermehrung von <i>Escherichia coli</i>	34
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl durch Messung der optischen Dichte.....	34
3.1.4 Präparation und Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock	34
3.1.5 Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Elektroporation.....	35
3.1.6 Tropftest zur Analyse der Lebensfähigkeit/ Komplementationstest.....	35
3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	36
3.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen	36
3.2.2 Isolierung von DNA aus wässrigen Lösungen	36
3.2.2.1 Fällung mit Ethanol.....	36
3.2.2.2 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (Phenol-Chloroform).....	36
3.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	37
3.2.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).....	37
3.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen.....	37
3.2.6 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	38
3.2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Invisorb® Spin Plasmid Mini Two)	38
3.2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Qiagen Plasmid Midi).....	38
3.2.7 Homologe Rekombination nach [Datsenko and Wanner, 2000].....	39
3.2.8 <i>In vitro</i> Transkription/Translation mit dem PURExpress™ <i>In Vitro</i> Protein Synthesis Kit (NEB)	39
3.3 Enzymatische Manipulation von DNA	40
3.3.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	40
3.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten.....	41
3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
3.3.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	42
3.3.3.2 Polymerasekettenreaktion auf ganze Zellen (Kolonie-PCR)	42
3.3.3.3 <i>Quick change mutagenesis</i> -PCR (QC-PCR)	43
3.3.3.4 PCR für Sequenzierung.....	44
3.3.4 Verdau von methylierter DNA mit <i>DpnI</i>	44
3.4 Proteinchemische Arbeitsmethoden	45
3.4.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	45
3.4.1.1. Herstellung von Polyacrylamidgelen (12,5 %, 15 %, 17,5 %) für den immunochemischen Nachweis von Proteinen (<i>Western Blot</i>).....	45
3.4.1.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	46
3.4.1.3 Färbung der Polyacrylamidgele.....	46
3.4.2 Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (<i>Western Blot</i>).....	46

INHALTSVERZEICHNIS

3.4.2.1 Proteinnachweis über die Bindung von Antikörper-gekoppelter Alkalischer Phosphatase	47
3.4.2.2 Proteinnachweis über die Bindung von Antikörper-gekoppelter Merretich-Peroxidase	47
3.4.3 Autoradiographie	48
3.4.4 Isolierung von Proteinen aus <i>E. coli</i>	48
3.4.4.1 Isolierung von Proteinen aus dem Periplasma von <i>E. coli</i> im präparativen Maßstab	48
3.4.4.2 Isolierung von Proteinen aus dem Cytoplasma von <i>E. coli</i> im präparativen Maßstab	49
3.4.4.3 Isolierung von ρ BPA-Proteinen aus dem Periplasma von <i>E. coli</i> im präparativen Maßstab	49
3.4.5 Reinigung von Proteinen	50
3.4.5.1 Reinigung über immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)	50
3.4.5.2 Proteinreinigung mittels Gelfiltrations-Chromatographie	50
3.4.5.3 Konzentration von Proteinlösungen mit Centriprep-Konzentratoren	51
3.4.5.4 Dialyse von Proteinlösungen	51
3.4.5.5 Lagerung der SurA-Proteine	51
3.5 Spektroskopische Arbeitsmethoden	51
3.5.1 Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie von MTSSL-markierten SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteinen	51
3.5.1.1 Theoretischer Hintergrund der ESR-Spektroskopie	51
3.5.1.2 Markierung von SurA-Cys-Proteinen mit der Radikalsonde MTSSL	55
3.5.1.3 Markierung von SurAI-Cys-Proteinen mit der Radikalsonde MTSSL	56
3.5.1.4 Messung des Immobilisationsgrades der Radikalsonde MTSSL nach ortsspezifischer Kopplung an SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteine	56
3.5.2 Fluoreszenzspektroskopie	57
3.5.3 ToxR-Assay	58
4 Ergebnisse	60
4.1 Analyse der Interaktion von Peptiden mit MTSSL-markierten SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteinen durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	60
4.1.1 Auswahl von Aminosäuren im SurA-Protein zur positionsspezifischen Markierung mit der Radikalsonde MTSSL	60
4.1.1.1 Auswahl der mit MTSSL zu markierenden Positionen im SurA-Gesamtprotein	61
4.1.1.2 Auswahl der mit MTSSL zu markierenden Positionen in Parvulin-Domäne I von SurA	62
4.1.2 Generierung der SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteine	64
4.1.2.1 Generierung der SurA-Cys-Proteine	64
4.1.2.2 Generierung der SurAI-Cys-Proteine	66
4.1.3 ESR-spektroskopische Untersuchung der Peptid-SurA-Interaktion	66
4.1.3.1 Grundlagen und Durchführung der Messungen der ESR-Spektroskopie	66
4.1.3.2 Analyse der SurA-Peptid-Interaktion mittels ESR-Spektroskopie	68
4.1.3.3 Analyse der Interaktion der isolierten Parvulin-Domäne I von SurA mittels ESR-Spektroskopie	71

INHALTSVERZEICHNIS

4.1.4 Analyse der Funktionalität und der Sekundärstruktur des Proteins SurAI_M231C.....	75
4.1.4.1 Analyse der Sekundärstrukturen der Proteine SurAI und SurAI_M231C mittels <i>Circular Dichroism Spectroscopy</i> (CD-Spektroskopie).....	75
4.1.4.2 Analyse der Interaktion von SurAI und SurAI_M231C mit fluoreszenzmarkierten Peptiden	76
4.2 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels des ToxR-Systems.....	78
4.2.1 Auswahl der Positionen für die Aufhebung der Substrat- bzw. Protein-vermittelten Interaktionen in SurA	79
4.2.3 Generierung der Plasmide und Interaktions-Mutanten für die ToxR-Assays	81
4.2.4 Analyse der <i>in vivo</i> -Funktion der im ToxR-Assay verwendeten SurA-Varianten	82
4.2.5 Untersuchung der Substrat- bzw. Protein-vermittelten Interaktion von SurA-Fusionsproteinen (unmutierte SurA-Varianten).....	84
4.2.6 Untersuchung der Substrat- bzw. Protein-vermittelten Interaktion von SurA-Fusionsproteinen (mutierte SurA-Varianten)	86
4.2.6.1 Analyse der ToxR'SurAI-Varianten	87
4.2.6.2 Analyse der ToxR'SurAI+II-Varianten.....	87
4.2.6.3 Analyse der ToxR'SurANCt-Varianten.....	88
4.2.6.4 Analyse der ToxR'SurANIICt-Varianten.....	88
4.2.6.5 Analyse der ToxR'SurANICt-Varianten	90
4.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Untersuchung der Substrat-bzw. Protein-vermittelten Interaktion von mutierten ToxR'SurA-Fusionsproteinen	91
4.3 Grundlagen zur Methodik der ortsspezifischen Quervernetzung von Peptiden bzw. Proteinen an das periplasmatische Chaperon SurA	93
4.3.1 Generierung der Vektoren und des Proteinexpressionsstammes für die Versuche der ortsspezifischen Quervernetzung.....	94
4.3.1.1 Auswahl der LamB-Peptide	94
4.3.1.2 Generierung der OMP-Polypeptid-kodierenden Vektoren pQE-PLStrep und pQE-LPLStrep.....	95
4.3.1.3 Generierung der Vektoren pTOPO-PLStrep, pTOPO-LPLStrep und pTOPO-LamB.....	96
4.3.1.4 Autoradiographie von <i>in vitro</i> synthetisiertem LamB-Protein.....	96
4.3.1.5 Generierung der Vektoren pEXP5-CT/PLStrep, pEXP5-CT/LPLStrep und pEXP5-CT/LamB	98
4.3.2 <i>In vitro</i> Transkription/Translation von LamB-Polypeptiden und des LamB-Proteins.....	98
4.3.3 Produktion von SurA- bzw. SurAI- β BPA-Proteinen für die gezielte ortsspezifische Quervernetzung von Peptiden bzw. Proteinen.....	100
4.3.3.1 Generierung der Plasmide für die Produktion von SurA- β BPA-Varianten	100
4.3.3.2 Generierung eines <i>surA</i> -defizienten Protein-Produktionsstammes.....	101
4.3.4 Analyse der <i>in vivo</i> -Funktion der β BPA-haltigen SurA-Proteine	102

INHALTSVERZEICHNIS

4.3.5 Expression von SurAI- bzw. SurA- β BPA-Proteinen.....	104
4.3.5.1 Testproduktion der β BPA-haltigen SurA-Proteine im neu-generierten Proteinproduktionsstamm YM10219.....	104
4.3.5.2 Produktion der SurA- β BPA-Proteine im präparativen Maßstab.....	106
5 Diskussion.....	108
5.1 Analyse der Interaktion von Peptiden mit MTSSL-markierten SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteinen mittels ESR-Spektroskopie.....	108
5.1.1 Analyse der Interaktion von Peptiden mit MTSSL-markierten SurA-Cys-Proteinen	108
5.1.2 Analyse der Interaktion von Peptiden mit MTSSL-markierten SurAI-Cys-Proteinen.....	109
5.2 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels des ToxR-Systems.....	114
5.2.1 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Substratbindung an die Parvulin-Domäne I und der <i>in vivo</i> -Oligomerisierung von SurA	115
5.2.2 Untersuchung der Rolle der in den kristallographischen Strukturen beobachteten SurA:SurA-Kontakte <i>in vivo</i>	116
5.2.3 Untersuchung der Substratbindung der PPIase-aktiven Parvulin-Domäne II von SurA.....	117
5.2.4 Zusammenfassung der Analyse der <i>in vivo</i> -Oligomerisierung von SurA im ToxR-System.....	118
5.3 Grundlagen zur Methodik der ortsspezifischen Quervernetzung von LamB-Polypeptiden an das periplasmatische Chaperon SurA	120
5.3.1 Generierung von LamB-Polypeptid-Substraten für Quervernetzung mit SurA	121
5.3.2 Generierung von SurA- β BPA-Proteinen für die ortsspezifische Quervernetzung von OMP-Polypeptiden	122
5.3.3 Zusammenfassung und Ausblick der ortsspezifischen Quervernetzung.....	124
Literaturverzeichnis.....	125
Anhang.....	140
Abkürzungsverzeichnis.....	142
Danksagung.....	144
Publikationsliste.....	145
Erklärung	146

Zusammenfassung

Das SurA-Protein ist ein wichtiger Bestandteil der periplasmatischen Faltungsmaschinerie in *Escherichia coli*. Doch trotz zahlreicher Erkenntnisse seit seiner Entdeckung im Jahr 1990, konnten die detaillierten Mechanismen der Substraterkennung und -bindung noch nicht abschließend geklärt werden. SurA ist unter anderem wichtig für das Wachstum und das Überleben uropathogener *E. coli*s innerhalb der Wirtszelle. Aufgrund dieses Einflusses von SurA auf die Pathogenität uropathogener *E. coli*-Stämme sind weiterreichende Kenntnisse bezüglich möglicher Substratbindestellen innerhalb des Proteins von Bedeutung, um SurA als potentielles Wirkstofftarget in Gram-negativen Bakterien zu nutzen. Zusätzlich sind derartige Informationen hilfreich, um den Chaperonmechanismus im Periplasma auf die Spur zu kommen. Dieser muss sich vom hauptsächlich ATP-abhängigen Chaperonmechanismus im Cytoplasma unterscheiden, da im Periplasma kein ATP zur Verfügung steht.

Das SurA-Protein ist aus einem Kernmodul und der PPIase-aktiven Parvulin-Domäne II, die über ein Verbindungsstück mit dem Kernmodul verbunden ist, aufgebaut. Das Kernmodul setzt sich aus der PPIase-inaktiven Parvulin-Domäne I und dem Chaperon-Modul zusammen, welches aus dem N-terminalen Bereich und einer C-terminalen Helix besteht.

Die Peptidbindestelle des artifiziellen Peptides PepC in der PPIase-inaktiven Parvulin-Domäne I von SurA ist zu Beginn der hier beschriebenen Arbeiten veröffentlicht worden. In den kristallographischen Strukturen ist dieses Peptid zwischen zwei SurANICT-Proteinen gebunden. Bei dieser SurA-Variante ist die Parvulin-Domäne II deletiert. Da es sich bei dem verwendeten Peptid um ein artifizielles Peptid handelte, stellte sich die Frage, ob auch biologisch relevante, natürliche Peptide an dieser postulierten Substratbindestelle in der Parvulin-Domäne I von SurA binden. Da das SurA-Protein auch ohne die Parvulin-Domäne I *in vivo* funktionstüchtig ist, sollte auch untersucht werden, ob und wo es noch weitere Substratbindestellen innerhalb von SurA gibt.

In ESR-spektroskopischen Versuchen wurde sowohl die Interaktion von SurA mit dem artifiziellen Peptid, als auch seine Interaktion mit Peptiden einer LamB-Peptid-Bibliothek untersucht. Die Experimente wurden zunächst mit dem SurA-Gesamtprotein durchgeführt. Doch im Kontext des Gesamtproteins war die Markierung der gewünschten Positionen mit der Radikalsonde MTSSL teilweise nicht möglich, so dass die weiteren Untersuchungen mit der isolierten Parvulin-Domäne I von SurA durchgeführt wurden. Von den drei untersuchten LamB-Peptiden, die in Vorarbeiten als SurA-Binder identifiziert worden waren, konnte nur für das Peptid Pep46 eine Bindung an die Parvulin-Domäne I im Bereich der postulierten Substratbindestelle nachgewiesen werden. Auch die Interaktion des artifiziellen Peptides PepC konnte mit dieser Methodik bestätigt werden. Insgesamt wurde die Methode der ESR-Spektroskopie jedoch als nur begrenzt einsetzbar bewertet, um Interaktionen (spezifisch oder unspezifisch) von Peptiden mit dem SurA-Protein zu untersuchen, da selbst die Detektion der mittels verschiedener Verfahren nachgewiesenen Bindung von PepC nur schwer möglich war.

Mittels des genetischen Indikatorsystems ToxR wurden Kontaktpunkte zwischen dimerisierten SurA-Untereinheiten bzw. zwischen SurA und Peptid untersucht. Parallel zu diesen ToxR-Assays wurden

ZUSAMMENFASSUNG

Analysen der zellulären Proteinkonzentration der untersuchten Varianten und der Fähigkeit zur Komplementation eines synthetisch letalen Phänotyps durchgeführt. Über einen Komplementationstest ließen sich Rückschlüsse auf die *in vivo*-Funktion des SurA-Proteins ziehen.

Um den Zusammenhang zwischen der Substratbindung an die Parvulin-Domäne I und der *in vivo*-Oligomerisierung von SurA zu untersuchen, wurden gezielt Aminosäuren in der Parvulin-Domäne I mutiert, um die bindungsinduzierte Dimerisierung zu unterbinden. Durch Mutation der Positionen M231, L239 und F243 konnte die durch Substratbindung vermittelte Dimerisierung der isolierten Parvulin-Domäne I von SurA verhindert werden. Weiterhin wurden auch Positionen innerhalb des SurA-Proteins mutiert, die die SurA:SurA-Kontakte unterbinden und somit die Dimerisierung des SurA-Proteins verhindern sollte. Auch die kombinierte Mutation von aus den kristallographischen Strukturen ermittelten Kontakten führte in den Versuchen zu keiner vollständigen Verhinderung der Oligomerisierung der untersuchten Proteine, auch wenn nur isolierte Domänen von SurA untersucht worden sind. Dies spricht dafür, dass im Kontext des SurA-Proteins noch weitere Kontakte an der Dimerisierung beteiligt sind, als in der kristallographischen Struktur erkennbar sind.

In den durchgeführten Versuchen hatte die Mutation der Aminosäuren, die in den kristallographischen Strukturen als Kontaktstellen beobachtet worden sind, keinen Einfluss auf die *in vivo*-Funktion von SurA. Auch die Kombination verschiedener Mutationen in SurA führte zu keinem Verlust seiner Fähigkeit zur Komplementation des synthetisch letalen Phänotypen einer *surA skp*-Doppelmutante. Weiterhin wurde untersucht, ob die PPIase-aktive Parvulin-Domäne II von SurA ebenfalls Substrat bindet. Diese Ergebnisse konnten aufgrund von großen Schwankungen der zellulären Proteinkonzentration durch die Einführung der Mutationen nur bedingt ausgewertet werden.

Abschließend wurde die Methodik der photoaktivierbaren, ortsspezifischen Quervernetzung von OMP-Polypeptiden an SurA- bzw. SurAI-Proteine etabliert. Für diese Methode wird das *amber*-Stopp-Codon gezielt in das *surA*-Gen eingeführt, damit an dieser Stelle die unnatürliche Aminosäure *p*BPA ortsspezifisch in SurA bzw. SurAI integriert werden kann. Die für die Produktion der SurA-*p*BPA- bzw. SurAI-*p*BPA-Proteine erforderlichen Stämme und Vektoren wurden generiert und die ersten Proteinproduktionen im präparativen Maßstab erfolgreich durchgeführt. Die für die *in vitro* Synthese der OMP-Polypeptide benötigten Vektoren wurden ebenfalls generiert und die OMP-Polypeptide mit Hilfe eines *in vitro*-Transkription/Translations-Kits synthetisiert. Damit wurden die Vorarbeiten für die Analyse der SurA:OMP-Polypeptid-Interaktion gelegt.

Schlagworte: *Escherichia coli*, SurA, Chaperon, PPIase, Peptid, Substratbindestelle, OMP, Parvulin, ESR-Spektroskopie, Dimerisierung, ortsspezifische Quervernetzung

Summary

The SurA protein is an important part of the periplasmic folding machinery in *Escherichia coli*. Despite numerous findings since it was discovered in 1990 the detailed mechanism of substrate recognition and binding could not completely be resolved. SurA is among others important for growth and survival of uropathogenic *E. coli* in their host cell. Due to this influence of SurA on pathogenesis of uropathogenic *E. coli* strains it is of interest to gain further knowledge regarding potential substrate binding sites within the protein, which could serve as potential drug target in gram negative bacteria. Additionally this information could help to unravel the chaperone mechanism in the periplasm. This should be different of the ATP-dependent chaperone mechanism in the cytoplasm, because of the lack of ATP in the periplasm. The SurA protein is organized in a core module and the PPIase active parvulin domain II, which is connected by a linker to the core module. The core module consists of the PPIase inactive parvulin domain I and the chaperone module, which is composed of the N-terminal region and a C-terminal helix. In the beginning of the hereby described thesis the peptide binding of the artificial peptide PepC was published in the PPIase inactive parvulin domain I. In crystal structures this peptide is bound between two SurANICt proteins. In this SurA variant the parvulin domain II is deleted. Due to the fact that the used peptide was of artificial origin the question was raised whether biological relevant, natural peptides would also bind to the postulated substrate binding site in parvulin domain I of SurA. The SurA protein is also fully functional *in vivo* without the parvulin domain I. Therefore it should also be investigated if additional substrate binding sites exist within the SurA protein and where these are located.

In ESR-spectroscopy experiments both the interaction of SurA with the artificial peptide and its interaction with peptides of a LamB peptide library were examined. First experiments were performed with the whole SurA protein. Labelling with the spin label MTSSL of the desired position was partly not possible in context of the whole protein, so further investigations were performed with the isolated parvulin domain I of SurA. Three LamB peptides, which were identified as binder of SurA, were tested, but only for peptide Pep46 binding at parvulin domain I could be detected. Interaction of the artificial peptide PepC could also be verified with this method. Binding of PepC was confirmed by several techniques, but even this was hard to detect with ESR-spectroscopy. Therefore this method was judged to be limited applicable to investigate the (specific or non-specific) interactions of peptides with the SurA protein.

Contact points between dimerized SurA subunits respectively between SurA and peptide were examined by using the genetic indicator system ToxR. In parallel to the ToxR assays the cellular protein concentration of the investigated variants were analyzed and the capability to complement a synthetic lethal phenotype was tested. By this complementation test conclusions from the *in vivo* function of the SurA protein could be drawn.

To investigate the relation between substrate binding to parvulin domain I and the *in vivo* oligomerization of SurA specific amino acids in parvulin domain I were selectively mutated to suppress the binding induced dimerization. By mutating positions M231, L239 and F243 the dimerization mediated by substrate

SUMMARY

binding of parvulin domain I of SurA was prevented. Furthermore positions in the SurA protein were mutated which should inhibit SurA:SurA contacts and hence prevent dimerization of the SurA protein. The combined mutation of contacts determined in the crystal structures did not result in a complete inhibition of oligomerization of the investigated proteins in the experiments, even if only isolated domains of SurA were examined. This argues that in context of the SurA protein more contacts take part in dimerization than were observable in the crystal structure.

The mutation of amino acids which were observed to be a point of contact in the crystal structures had no impact on the *in vivo* function of SurA in the executed experiments. The combination of different mutations did also not induce the loss of the capability to complement the synthetic lethal phenotype of a *surA skp* double mutant. Furthermore it was investigated whether the PPIase active parvulin domain II of SurA can bind substrate as well. These results could only be limited evaluated due to high variations in the cellular protein concentration by introduction of the mutations.

Concluding the method of photoactivated site-specific crosslinking of OMP polypeptides to SurA respectively SurAI was established. For this method the *amber* stop codon is selectively introduced in the *surA* gene, to allow the site-specific integration of the unnatural amino acid *p*BPA in SurA respectively SurAI at this position. Strains and plasmids required for the production of the SurA-*p*BPA respectively SurAI-*p*BPA proteins were generated and first protein productions in preparative scale were successfully performed. Required plasmids for the *in vitro* synthesis of OMP polypeptides were also generated and OMP polypeptides synthesized by means of an *in vitro* transkription/translation kit. Thereby the preliminary work for the analysis of the SurA:OMP polypeptide interaction was conducted.

Key Words: *Escherichia coli*, SurA, chaperone, PPIase, peptide, substrate binding site, OMP, parvulin, ESR-spectroscopy, dimerisation, site-specific crosslinking

1 Einleitung

1.1 Die Zellhülle des Gram-negativen Bakteriums *Escherichia coli*

Der in dieser Arbeit untersuchte Organismus *Escherichia coli* (*E. coli*) gehört zur Klasse der Gram-negativen Bakterien. Zellen Gram-negativer Bakterien sind von zwei Membranen umhüllt, die zwei zelluläre Kompartimente voneinander trennen [Glauert and Thornley, 1969]. Die innere Membran (IM, *inner membrane*) ist eine das Cytoplasma umschließende Phospholipid-Doppelschicht. Ihr sind mehrere Schichten, unverzweigter Polysaccharidketten, die Peptidoglykane (Murein), aufgelagert, die durch kurze Peptidseitenketten miteinander vernetzt sind [Rogers, 1980]. Dieser sogenannte Murein-Sacculus bestimmt maßgeblich die äußere Form der Bakterien und hilft der Zelle, einen höheren osmotischen Druck als das sie umgebende Medium aufrecht zu erhalten [Schlegel, 1992; Vollmer and Holtje, 2001]. Aufgelagert auf die Peptidoglykanschicht befindet sich die äußere Membran (OM, *outer membrane*). Die OM ist durch Lpp-Proteine (Murein-Lipoprotein) mit der Peptidoglykanschicht verbunden [Braun, 1975]. Die äußere Membran ist eine asymmetrisch aufgebaute Lipiddoppelschicht mit Lipopolysacchariden (LPS) an der Außenseite [Muhlradt and Golecki, 1975] und Phospholipiden an der inneren Seite. Das dreigeteilte LPS-Molekül oder auch Endotoxin besteht aus Lipid A, einem kurzen Kernoligosaccharid und einem distalem Polysaccharid (O-Antigen) [Raetz and Whitfield, 2002]. LPS spielt eine essentielle Rolle in der Stabilität der äußeren Membran, was von größter Wichtigkeit für das Überleben Gram-negativer Bakterien unter diversen Umweltbedingungen ist. Des Weiteren bildet LPS durch seinen Aufbau eine Barriere gegen hydrophobe Antibiotika und ist damit Bestandteil der Antibiotika-Resistenz Gram-negativer Bakterien [Vaara, 1992]. In der Medizin dient LPS als ein Infektionsmarker und ist verantwortlich für den mit einer Sepsis assoziierten endotoxischen Schock durch Gram-negative Bakterien [Raetz and Whitfield, 2002].

Zusätzlich zu LPS und Phospholipiden beherbergt die OM noch zahlreiche Proteine. Dazu zählen die integralen Außenmembran-Proteine (OMPs, *outer membrane proteins*), die Lipoproteine, die der OM auf periplasmatischer Seite angelagert sind, und die Haar-ähnlichen Strukturen der Zelloberfläche, wie *Pili* und *Fimbriae*. Die Mechanismen des Transports zur und der Insertion in die OM sind für die beiden letztgenannten Proteingruppen recht gut beschrieben [Li and Thanassi, 2009; Tokuda, 2009], für die OMPs hingegen bisher nur teilweise geklärt. Die Proteinzusammensetzung der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien ist sehr unterschiedlich (Übersichtsartikel hierzu sind z.B.: [Buchanan, 1999; Wimley, 2003]).

Zwischen der äußeren und der inneren Membran ist das Periplasma lokalisiert, welches dicht mit Proteinen gepackt ist und fast eine Gel-artige Konsistenz besitzt [Mullineaux *et al.*, 2006] (Abb. 1).

Die äußere Membran dient einerseits als eine schützende Barriere gegen externe Einflüsse und toxische Substanzen, wie z.B. hydrophobe Detergenzien oder Antibiotika, andererseits erlaubt sie den Stoffaustausch und den direkten Kontakt mit der Umwelt. OMPs bestehen im Gegensatz zu Proteinen der inneren Membran, aus antiparallelen β -Strängen, die eine Fass-artige Struktur mit einem hydrophilen

EINLEITUNG

Innenraum bilden [Koebnik *et al.*, 2000]. Ein Beispiel hierfür ist das monomere OMP OmpA, welches in der Lage ist, zwei verschiedene Konformationen anzunehmen [Arora *et al.*, 2000].

Eine Hauptklasse der OMPs sind die trimeren Poren-bildenden Proteine, die sogenannten Porine. Über sie können niedermolekulare, hydrophile Moleküle, wie z.B. Zucker und Aminosäuren, sowie einige spezifische Substrate und auch Abfallprodukte frei über die OM mit dem äußeren Medium ausgetauscht werden [Nikaido, 1994, 1996, 2003]. Die Poren dieser Proteine können vollständig oder auch nur zum Teil durch Einwärtsfaltung von Schleifen („*loops*“) oder des N-Terminus geschlossen sein [Cowan *et al.*, 1992; Buchanan, 1999; Basle *et al.*, 2006]. Die freie Diffusion von hydrophilen Molekülen, die größer als 700 Dalton sind, ist stark eingeschränkt [Nikaido, 2003]. Dies macht die äußere Membran zu einer effizienten, aber auch selektiv permeablen Barriere. Durch diesen Austausch mit dem extrazellulären Raum wird das Milieu im Periplasma stark von den Bedingungen der Umwelt beeinflusst [Wulfing and Pluckthun, 1994]. Zu den trimeren Porinen gehören die Proteine OmpF, OmpC und PhoE [Cowan *et al.*, 1992], sowie LamB [Schirmer *et al.*, 1995].

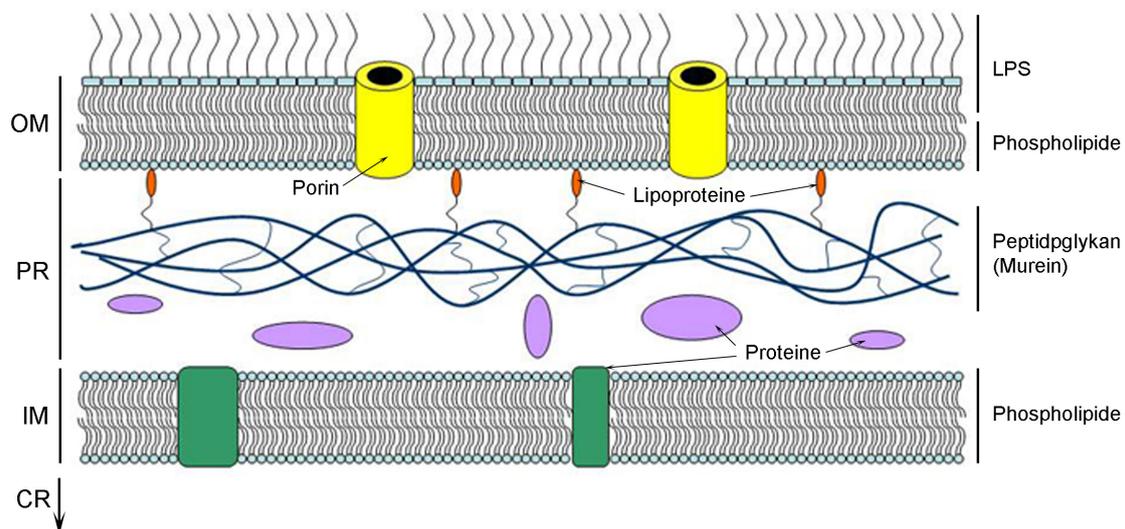


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zellhülle Gram-negativer Bakterien (modifiziert nach [Schlegel, 1992]). Die innere Membran (*inner membrane*, IM) ist eine den cytoplasmatischen Raum (CR, Cytoplasma) umschließende Phospholipid-Doppelschicht. Ihr aufgelagert ist eine verzweigte Peptidoglykanschicht (Murein), die über Lipoproteine vernetzt und mit der äußeren Membran (*outer membrane*, OM) verbunden ist. Die OM ist eine asymmetrisch aufgebaute Membran aus Phospholipiden und Lipopolysaccharid (LPS), die den perioplasmatischen Raum (PR, Periplasma) umschließt. Über integrale trimere Poren-bildende Proteine (Porine) können u.a. niedermolekulare, hydrophile Moleküle frei mit dem äußeren Medium ausgetauscht werden.

Des Weiteren kann die extrazelluläre Sekretion von Proteinen oder der Efflux von toxischen Molekülen durch Proteinkomplexe erfolgen, die beide Membranen, die IM und die OM, durchspannen. Das OMP TolC bildet bspw. einen stabilen Komplex mit den Proteinen AcrA und AcrB der inneren Membran [Tikhonova and Zgurskaya, 2004; Symmons *et al.*, 2009]. Dieser Komplex entspricht einer so genannten Efflux-Pump, die toxische Moleküle (bspw. Antibiotika) aus dem Inneren der Zelle in das sie umgebende Medium transportiert. Sie ist auch eine Ursache der verbreiteten Antibiotika-Resistenzen [Koronakis *et al.*, 2000; Eswaran *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006].

EINLEITUNG

Die Synthese der Proteine des Periplasmas und der äußeren Membran erfolgt im Cytoplasma. Periplasmatische Proteine und Proteine der äußeren Membran werden nach ihrer Synthese ungefaltete über die Cytoplasmamembran transportiert und in das Periplasma entlassen. Zur Unterstützung ihrer Faltung werden daher auch im periplasmatischen Raum Faltungskatalysatoren und Chaperone benötigt. Faltungskatalysatoren beschleunigen geschwindigkeitslimitierende Schritte der Proteinfaltung (Details s. 1.3). Chaperone (engl. Anstandsdamen) schützen neu synthetisierte Polypeptide und denaturierte Proteine vor Fehlfaltung und Aggregation und unterstützen so ihre Faltung in die korrekte endgültige Konformation [Bukau and Horwich, 1998].

Die schon seit längerem bekannten Chaperone im Cytoplasma unterstützen die Faltung von Proteinen unter energiereichen Bedingungen, meist unter Zuhilfenahme von ATP [Craig, 1993; Bukau and Horwich, 1998; Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Cross *et al.*, 2009]. Im Periplasma steht jedoch kein ATP zur Verfügung [Wulfiging and Pluckthun, 1994] und die Funktionsweise periplasmatischer Chaperone ist bisher weitgehend ungeklärt.

1.2 Faltungswege der OMPs im Periplasma

Integrale OMPs werden als Vorläufer mit einer N-terminalen Signalsequenz im Cytoplasma synthetisiert [Driessen and Nouwen, 2008] und ungefaltete mit Hilfe des Sec-Translocons (SecYEG) über die innere Membran transportiert [Van den Berg *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007]. Dieser Prozess kann durch das cytoplasmatische Chaperon DnaK unterstützt werden [Qi *et al.*, 2002].

Sowohl die Signalsequenz als auch das Sec-Translocon sind stark konserviert [Rapoport, 2007]. SecA ist eine ATPase und hauptverantwortlich für den Transfer der ungefalteten Proteine in das Periplasma [Zimmer *et al.*, 2008]. Es bindet an naszierende Proteine im Cytoplasma und unterstützt deren Translokation [Gelis *et al.*, 2007; Rapoport, 2007]. SecB ist ein molekulares Chaperon, welches die Signalsequenzen von OMP-Vorläufern bindet, sobald diese das Ribosom verlassen. Für die Vorläufer von OmpA (pro-OmpA: [Lecker *et al.*, 1990; Behrmann *et al.*, 1998]), sowie die OMPs PhoE [de Cock *et al.*, 1992] und LamB [Ernst *et al.*, 1994; Ureta *et al.*, 2007] konnte diese Interaktion schon definitiv nachgewiesen werden. SecB geleitet die gebundenen Vorläufer-Proteine im ungefalteten Zustand zum SecA-Motor, da gefaltete Proteine vom Sec-Translocon nicht in das Periplasma transportiert werden können [Randall and Hardy, 2002]. Durch Interaktion von SecA und SecB wird das Vorläufer-Protein an SecA übertragen und SecB wird freigesetzt [Fekkes *et al.*, 1997] (Abb. 2).

Nach der Translokation durch SecYEG wird in der inneren Membran die Signalsequenz durch die SP-1 Signalpeptidase entfernt [Paetzel *et al.*, 2002]. Danach sind die noch ungefalteten Proteine für periplasmatische Chaperone zugänglich [Eppens *et al.*, 1997].

Bisher sind die Proteine SurA [Behrens *et al.*, 2001; Bitto and McKay, 2003], Skp [Chen and Henning, 1996; Walton *et al.*, 2009] und DegP [Krojer *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2009], die über eine generelle Chaperon-Aktivität für OMPs verfügen, ausführlicher untersucht worden. Des Weiteren ist eine generelle Chaperon-Aktivität auch für PpiD nachgewiesen worden, seine ursprünglich postulierte Rolle in der Reifung der OMPs wurde jedoch widerlegt [Matern *et al.*, 2010].

EINLEITUNG

Ob die oben genannten, in die OMP-Reifung involvierten periplasmatischen Chaperone in funktionell redundanten, parallelen Wegen der Proteinfaltung [Rizzitello *et al.*, 2001; Sklar *et al.*, 2007b] oder nacheinander im selben Weg agieren [Bos *et al.*, 2007], ist noch nicht abschließend geklärt worden. Bisher ist in der Literatur der Ansatz favorisiert worden, dass SurA in einem und Skp/DegP in einem hierzu parallelen Faltungsweg agieren. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass sowohl Zellen ohne SurA und Skp, als auch ohne SurA und DegP nicht lebensfähig sind und erhebliche Defizite in der OMP-Assemblierung zeigen [Rizzitello *et al.*, 2001]. Eventuell wäre auch eine partielle Redundanz der beiden Faltungswege möglich. Es ist gezeigt worden, dass sowohl Skp als auch SurA an der Faltung und Insertion des Außenmembranproteins LptD beteiligt sind. Die genetische Deletion des einen Proteins kann jedoch nicht durch die Überexpression des anderen Proteins kompensiert werden [Schwalm *et al.*, 2013]. Die periplasmatischen Chaperone SurA und Skp transportieren die ungefalteten OMPs durch den periplasmatischen Raum und übergeben sie an BamA, welches die OMPs in die äußere Membran einbaut [Ieva and Bernstein, 2009].

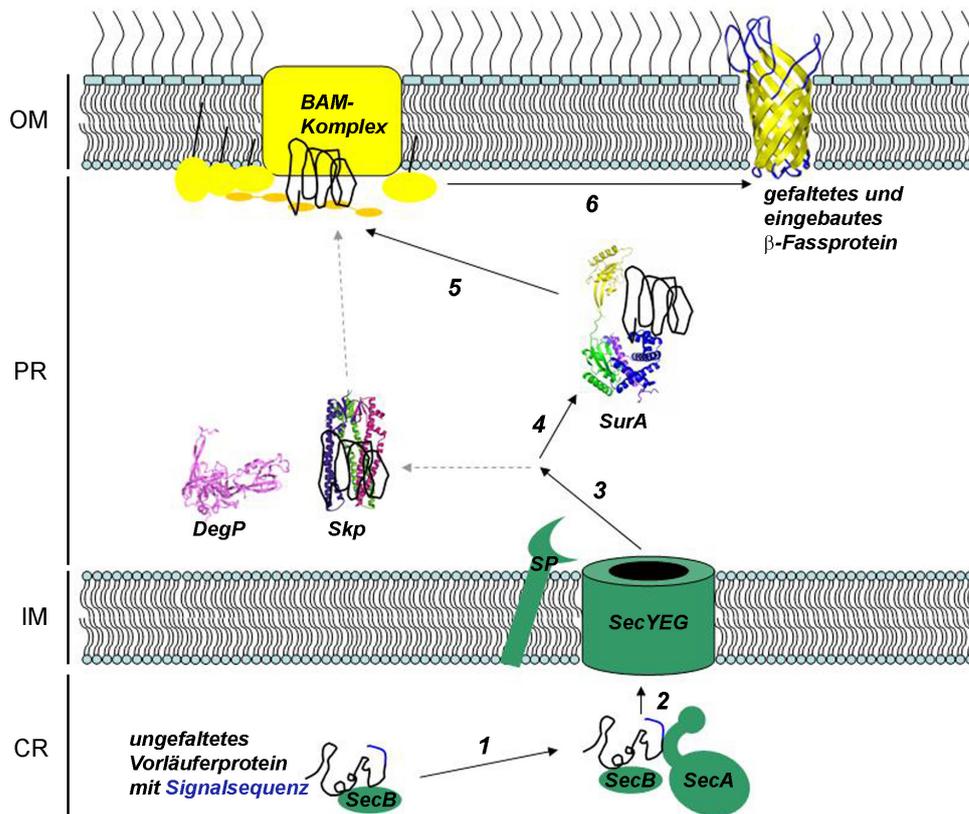


Abb. 2: Faltungswege der integralen β -Fass-Außenmembranproteine (outer membrane proteins, OMPs). Abbildung modifiziert nach [Gatsos *et al.*, 2008]. Die integralen OMPs werden im Cytoplasma synthetisiert. (1) Das molekulare Chaperon SecB bindet, die mit einer Signalsequenz versehenen, ungefalteten Vorläuferproteine und überträgt diese an SecA. (2) Der Transport in das Periplasma erfolgt durch SecYEG und (3) die Signalpeptidase 1 (SP) entfernt die Signalsequenz. (4) Die prozessierten Proteine werden mit Hilfe von SurA ([Bitto and McKay, 2002]; PDB ID: 1M5Y) durch das Periplasma geleitet und (5) an der äußeren Membran an den BAM-Komplex übergeben. (6) Der BAM-Komplex katalysiert die Insertion der gefalteten OMPs in die äußere Membran (hier beispielhaft OmpA [Pautsch and Schulz, 1998]; PDB ID: 1BXW). Ein potentiell alternativer Weg der Proteinfaltung im Periplasma stellen die Chaperone Skp ([Walton and Sousa, 2004]; PDB ID: 1U2M) und DegP ([Krojer *et al.*, 2002]; PDB ID: 1KY9) dar. DegP besitzt auch eine Protease-Funktion und kann fehlgefaltete Proteine degradieren.

EINLEITUNG

Generell zeigen die Haupt-OMPs und auch das OMP LptD eine Präferenz für die Bindung an SurA [Sklar *et al.*, 2007b; Vertommen *et al.*, 2009]. Die Assoziation der ungefalteten Proteine mit SurA ist schon in mehreren Studien nachgewiesen worden [Tamm *et al.*, 2004; Mogensen and Otzen, 2005]. Es gibt Hinweise, dass in Abwesenheit von SurA die neu in das Periplasma entlassenen Proteine alternativ über den Skp/DegP-Faltungsweg zur äußeren Membran geleitet werden [Bitto and McKay, 2003; Kleinschmidt, 2003; Walton and Sousa, 2004; Sklar *et al.*, 2007b].

PpiD ist in der inneren Membran über die N-terminale Helix in der Nähe des SecYEG-Translocons verankert [Dartigalongue and Raina, 1998; Antonoaea *et al.*, 2008]. PpiD verfügt über drei periplasmatische Domänen. Die Domäne 1 von PpiD zeigt Sequenzähnlichkeit zur Chaperondomäne von SurA und von Trigger Faktor und es ist auch bereits eine Chaperon-Aktivität für PpiD nachgewiesen worden [Stymest and Klappa, 2008; Matern *et al.*, 2010]. Für Domäne 2 ist bestätigt worden, dass es sich um eine PPIase-inaktive Domäne des Parvulin-Typs handelt [Weininger *et al.*, 2010]. Die Funktion von Domäne 3 ist noch unbekannt. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass PpiD als ein generelles Chaperon für ein breites Substratspektrum wirkt [Matern *et al.*, 2010]. Seine Substratspezifität steht hiermit in Einklang [Stymest and Klappa, 2008]. Für PpiD wird eine Rolle als sogenannter „Pfortner“ am SecYEG-Translocon für neu in das Periplasma translozierte Proteine angenommen [Antonoaea *et al.*, 2008]. Aus diesem Grund wird auch vermutet, dass PpiD im Periplasma eine ähnliche Funktion inne hat, wie Trigger Faktor am Ribosom im Cytoplasma [Matern *et al.*, 2010]. Die genaue Funktion und Beteiligung seines Zusammenspiels mit anderen periplasmatischen Faltungshelfern ist jedoch noch nicht abschließend geklärt worden. Da die Beteiligung von PpiD an der Reifung der OMPs ebenfalls noch nicht bekannt ist, wurde PpiD nicht in die Darstellung der Faltungswege im Periplasma in Abbildung 2 aufgenommen.

1.3 Periplasmatische Faltungshelfer

In den periplasmatischen Faltungswegen wirken zahlreiche Faltungshelferproteine, die zum einen die Proteinfaltung unterstützen bzw. Aggregation verhindern und zum anderen Proteine proteolytisch degradieren können. Im Folgenden werden einige der beteiligten periplasmatischen Faltungshelfer kurz vorgestellt. Eine ausführliche Beschreibung des in dieser Arbeit näher untersuchten periplasmatischen Chaperons SurA ist in Kapitel 1.5 zu finden.

1.3.1 Periplasmatische Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen)

Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen) katalysieren die *cis-trans* Isomerisierung der Peptidbindung zwischen einer Aminosäure X und einem nachfolgenden Prolin [Fischer and Aumuller, 2003]. Durch Beschleunigung dieses geschwindigkeitslimitierenden Schrittes der Proteinfaltung erleichtern sie die effiziente Faltung und verkürzen somit signifikant die Zeitspanne bis zur korrekten Faltung [Ellis and Hartl, 1999]. Bekannte periplasmatische PPIasen sind die Proteine SurA [Rouviere and Gross, 1996], PpiD [Dartigalongue and Raina, 1998], PpiA (vormals RotA) [Liu and Walsh, 1990] und FkpA [Horne and Young, 1995]. Diese werden drei PPIase-Familien zugeordnet: den Parvulinen, den Cyclophilinen und den

EINLEITUNG

FK506-bindenden Proteinen (FKBP) [Rahfeld *et al.*, 1994a; Gothel and Marahiel, 1999; Fischer and Aumuller, 2003].

Durch Sequenzhomologien zu Parvulin (Par10), einer kleinen PPIase aus *E. coli*. [Rahfeld *et al.*, 1994b] sind sowohl das SurA-Protein [Lazar and Kolter, 1996; Missiakas *et al.*, 1996; Rouviere and Gross, 1996] als auch PpiD [Dartigalongue and Raina, 1998] den Parvulin-ähnlichen Peptidyl-Prolyl-Isomerasen zugeordnet worden. Zu dieser hoch-homologen Familie gehört auch das humane Protein Pin1 (*h*Pin1) [Bayer *et al.*, 2003]. Die Parvulin-ähnlichen Domänen dieser Proteine sind auch strukturell sehr ähnlich (Abb. 3). Ihre sogenannte Parvulin-Faltung besteht in der Regel aus vier antiparallelen β -Faltblättern, die von vier α -Helices umgeben werden ($\beta\alpha_3\beta\alpha_2$; [Fanghanel and Fischer, 2004]). Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeiten verfügen nur Par10, die Parvulin-Domäne II von SurA (SurAII) und *h*Pin1 über eine nachweisbare PPIase-Aktivität [Rahfeld *et al.*, 1994a; Rouviere and Gross, 1996; Yaffe *et al.*, 1997]. Sowohl die isolierte Parvulin-Domäne I von SurA (SurAI) als auch die Parvulin-Domäne von PpiD zeigen *in vitro* keine nachweisbare PPIase-Aktivität [Rouviere and Gross, 1996; Weininger *et al.*, 2010].

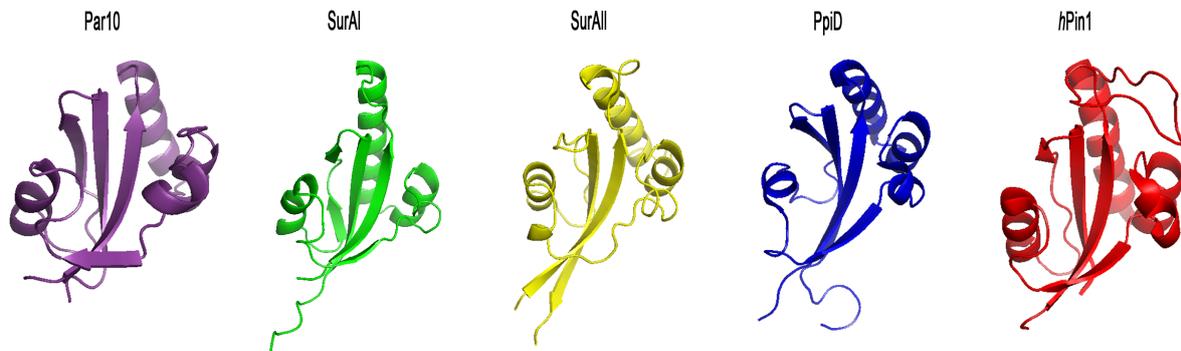


Abb. 3: Struktureller Vergleich von PPIase-Domänen aus der Familie der Parvuline. Die Familie der Parvuline weist ausgeprägte Homologien in der Sequenz und der Struktur auf. Dargestellt sind aus *Escherichia coli* das Protein Par10 ([Kuhlewein *et al.*, 2004]; PDB ID: 1JNS), sowie die Parvulin-Domänen I und II von SurA (SurAI bzw. SurAII; [Bitto and McKay, 2002]; PDB ID: 1M5Y) und die Parvulin-Domäne von PpiD ([Weininger *et al.*, 2010]; PDB ID: 2KGJ). Die Parvulin-Domäne des humanen Pin1 (*h*Pin1; [Bayer *et al.*, 2003]; PDB ID: 1NMW) weist ebenfalls Homologien zu den Parvulin-ähnlichen Domänen aus *E. coli* auf. Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeiten verfügen nur Par10, SurAII und *h*Pin1 über eine nachweisbare PPIase-Aktivität.

SurA verfügt im Vergleich zu PpiA nur über eine geringe PPIase-Aktivität [Rouviere and Gross, 1996; Behrens *et al.*, 2001]. Die ursprünglich postulierte hohe PPIase-Aktivität von PpiD [Dartigalongue and Raina, 1998] ist für die Parvulin-ähnliche Domäne von PpiD nicht bestätigt worden und diese stimmt strukturell weitestgehend mit der PPIase-inaktiven Parvulin-Domäne I von SurA überein [Weininger *et al.*, 2010]. Dahingegen sind PpiA und FkpA sehr PPIase-aktiv [Liu and Walsh, 1990; Arie *et al.*, 2001]. Das Protein FkpA gehört zur Familie der FK506-bindenden Proteinen (FKBP) [Horne and Young, 1995] und PpiA ist ein Homolog zu den humanen Cyclophilinen [Liu and Walsh, 1990]. Insgesamt ist PpiA die aktivste, periplasmatische PPIase. Wird PpiA deletiert, führt dies zu einer fast nicht mehr nachweisbaren PPIase-Aktivität in *E. coli* [Kleerebezem *et al.*, 1995]. Insgesamt hat die Funktion der periplasmatischen

PPIasen jedoch keinen nennenswerten Einfluss auf die Faltung der OMPs und spielt in deren Assemblierung eine eher untergeordnete Rolle [Kleerebezem *et al.*, 1995; Justice *et al.*, 2005].

Die Annahme, dass die gleichzeitige Deletion von SurA und PpiD synthetisch letal ist [Dartigalongue and Raina, 1998] wurde in späteren Studien widerlegt ([Justice *et al.*, 2005] und Arbeiten eigene AG). Auch die gleichzeitige Deletion aller vier periplasmatischen PPIasen hat keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen [Justice *et al.*, 2005].

Die periplasmatischen PPIasen kommen sowohl als Einzeldomänen- als auch als Multidomänen-Proteine vor. Bei den Letzteren fungiert die zusätzliche Domäne oft als Chaperon und erhöht die Bindungsaffinität, in einigen Fällen auch die Selektivität der PPIase für Protein-Substrate [Scholz *et al.*, 1997] oder führt zur Oligomerisierung der Proteine [Saul *et al.*, 2004]. Schon seit längerem ist eine Chaperonfunktion für SurA [Behrens *et al.*, 2001] und FkpA [Ramm and Pluckthun, 2000; Arie *et al.*, 2001; Ramm and Pluckthun, 2001] bekannt. Des Weiteren verfügt auch PpiD über eine Chaperon-Aktivität, die vermutlich einen frühen Schritt der Proteinfaltung der aus dem Cytoplasma translozierten Proteine unterstützt [Antonoaea *et al.*, 2008; Stymest and Klappa, 2008; Matern *et al.*, 2010].

1.3.2 Disulfidbrücken-Isomerasen

Bei der Faltung von Proteinen im Periplasma sind ebenfalls die Disulfid-Isomerasen DsbA und DsbC beteiligt, die Disulfidbrücken bei Proteinen mit Cysteinresten sowohl schaffen als auch isomerisieren können [Eppens *et al.*, 1997; Messens and Collet, 2006; Gleiter and Bardwell, 2008]. Elektronen werden durch das Protein DsbD aus dem Cytoplasma über die innere Membran in das Periplasma transportiert. Die Elektrone werden dazu genutzt Cysteinreste bestimmter Proteine in einem reduzierten Zustand zu halten [Katzen and Beckwith, 2000]. DsbA gehört zu den Thiol-Oxidase und katalysiert bspw. die Formierung einer Cysteinbindung im Porin PhoE während des Transits durch das Periplasma [Eppens *et al.*, 1997]. Hierbei werden die Cystein-Reste von DsbA oxidiert [Kadokura *et al.*, 2004].

Die Protein-Disulfid-Isomerase DsbC benötigt für die vollständige Funktion als Isomerase die Anwesenheit von DsbD [Katzen and Beckwith, 2000]. Während der oxidativen Faltung der periplasmatischen Proteine mit Cystein-Resten korrigiert DsbC von DsbA falsch gebildete Disulfid-Brücken [Messens and Collet, 2006; Gleiter and Bardwell, 2008]. Hierbei werden nicht-native Disulfide reduziert und die korrekten Bindungen können durch DsbA wieder hergestellt werden [Shouldice *et al.*, 2010]. DsbC ist ebenfalls an der Biogenese von LptD beteiligt [Denoncin *et al.*, 2010] und weist *in vitro* zusätzlich eine signifikante Chaperon-Aktivität auf [Chen *et al.*, 1999]. Die Zellen von *surA* und *dsbC* deletierten Mutanten wachsen sehr langsam, bleiben klein und weisen bei niedrigen Temperaturen einen Wachstumsdefekt auf. Dieser Phänotyp kann durch die Isomerase-Aktivität, jedoch nicht durch die Chaperon-Aktivität, von DsbC komplementiert werden [Denoncin *et al.*, 2010].

1.3.3 Die periplasmatische Protease DegP

Das periplasmatische Protein DegP besitzt sowohl eine Protease-Funktion für ungefaltete und fehlgefaltete Proteine als auch eine Chaperon-Funktion [Spiess *et al.*, 1999], wobei postuliert wird, dass die Protease-Funktion die wichtigere Rolle spielt [CastilloKeller and Misra, 2003]. Eine Beteiligung an der

OMP-Assemblierung wird angenommen, da eine *degP surA*-Doppelmutation in einem letalen Phänotyp resultiert [Rizzitello *et al.*, 2001]. Aus diesem Grund wird vermutet, dass DegP zusammen mit Skp in einem zu SurA parallelen Faltungsweg agiert.

1.3.4 Das periplasmatische Chaperon Skp

Das 17 kDa kleine periplasmatische Protein Skp verfügt über eine generelle Chaperonaktivität [Chen and Henning, 1996; Missiakas *et al.*, 1996]. Der strukturelle Aufbau des periplasmatischen Chaperons Skp besteht aus drei langen α -helikalen Tentakel-ähnlichen Strukturen, die von einer zentralen β -Fass Struktur ausgehen und Ähnlichkeit mit einer Qualle aufweist (siehe Abb. 2) [Korndorfer *et al.*, 2004; Walton and Sousa, 2004]. In dem es Proteine in dieser Quallen-ähnlichen Struktur einschließt, verhindert Skp die Aggregation der Proteine auf dem Weg durch das Periplasma [Walton *et al.*, 2009]. Somit kann das Skp-Protein der Klasse der sogenannten „*holding*“ (= haltenden) Chaperone zugeordnet werden [Stirling *et al.*, 2003; Walton and Sousa, 2004]. Diese Klasse steht im Gegensatz zu den „*foldings*“ (= faltenden) Chaperonen, die die Proteinfaltung aktiv unterstützen [Stirling *et al.*, 2003].

1.4 Einbau der OMPs in die äußere Membran durch den BAM-Komplex

Die periplasmatischen Faltungshelfer geleiten die OMPs zum BAM-Komplex (*β -barrel assembly machinery*) in der äußeren Membran, welcher die OMPs in die äußere Membran einbaut [Wu *et al.*, 2005]. Für diesen Prozess ist keine Energiezufuhr notwendig, sondern die Anwesenheit des BAM-Komplexes und SurA ist ausreichend [Hagan *et al.*, 2010]. Kürzlich wurde auch eine Interaktion eines Skp-OmpA-Komplexes mit BamA nachgewiesen [Patel and Kleinschmidt, 2013].

Der BAM-Komplex besteht aus dem integralen β -Fassprotein BamA (vormals YaeT, Omp85) und vier Lipoproteinen BamBCDE (vormals YfgL, NlpB, YfiO, SmpA) [Wu *et al.*, 2005; Sklar *et al.*, 2007a]. BamA und BamD sind essentiell für das Überleben der Zelle. Die Deletion oder Depletion einzelner Proteine des BAM-Komplexes verursacht Defekte in der Assemblierung von OMPs [Wu *et al.*, 2005; Malinverni *et al.*, 2006; Sklar *et al.*, 2007a]. Direkt an der Insertion der OMPs beteiligt ist BamA [Voulhoux *et al.*, 2003; Doerrler and Raetz, 2005]. Das essentielle, integrale β -Fassprotein besitzt fünf periplasmatische POTRA-Domänen (*polypeptide-transport-associated domains*) [Kim *et al.*, 2007; Misra, 2007]. Deletiert man eine der POTRA-Domänen, so erhält man in *E. coli* einen partiellen Defekt in der korrekten Assemblierung der OMPs [Robert *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007].

Der Prozess der β -Fassprotein-Assemblierung durch Mitglieder der BamA-Familie ist hoch konserviert. Diese Proteine sind in allen Bakterien, die eine Außenmembran besitzen, sowie in Mitochondrien gefunden worden [Gentle *et al.*, 2004; Cavalier-Smith, 2006]. Der gesamte Prozess der OMP-Assemblierung in der Zelle dauert zwischen 30 Sekunden und wenigen Minuten, was durch *pulse chase* Experimente demonstriert worden ist [Jansen *et al.*, 2000; Ureta *et al.*, 2007].

1.5 Das periplasmatische Chaperon SurA

Der Name des *surA*-Gens bezieht sich darauf, dass dieses als ein Gen identifiziert worden ist, dessen Abwesenheit das Überleben der Zellen während der stationären Wachstumsphase wesentlich beeinträchtigt (*sur* steht für *survival in stationary phase*) [Tormo *et al.*, 1990]. SurA gehört zur Familie der Parvuline (für Details siehe Abschnitt 1.3) und besitzt ein Molekulargewicht von 47,4 kDa [Rahfeld *et al.*, 1994b]. Auf Ebene der Primärstruktur kann man das Protein in vier Regionen unterteilen: zwei Parvulin-ähnliche PPIase-Domänen, eine knapp ein Drittel des Gesamtproteins umfassende amino-terminale und eine kurze carboxy-terminale Region (Abb. 4a). In bisher durchgeführten *in vitro* Analysen ist nur für die Parvulin-Domäne II eine PPIase-Aktivität nachgewiesen worden, wohingegen die Parvulin-Domäne I PPIase-inaktiv zu sein scheint [Rouviere and Gross, 1996; Behrens *et al.*, 2001]. Komplementationsstudien zeigen ferner, dass die PPIase-Aktivität für die *in vivo*-Funktion von SurA nicht essentiell ist, da auch ein um beide Parvulin-Domänen deletiertes SurA-Protein die Phänotypen einer *surA*-Mutante nahezu vollständig komplementiert [Behrens *et al.*, 2001]. Die PPIase-Aktivität spielt demnach *in vivo* eine untergeordnete Rolle oder wird durch Proteine mit redundanter Funktion ersetzt [Behrens *et al.*, 2001].

Das SurA-Protein kommt in vielen Bakteriengruppen, jedoch nicht in Eukaryoten, vor und die SurA-Sequenz ist hierbei relativ stark konserviert [Alcock *et al.*, 2008; Behrens-Kneip, 2010]. Von diesen Homologen besitzen einige keine oder lediglich eine Parvulin-Domäne. Welche der beiden im *E. coli*-Protein vorhandenen Parvulin-Domänen in den SurA-Homologen mit nur einer Parvulin-Domäne fehlt, ist nicht geklärt, aber es deutet vieles auf die PPIase-inaktive Parvulin-Domäne I hin [Alcock *et al.*, 2008; Behrens-Kneip, 2010].

Für die *in vivo*-Funktion von SurA ist eine Chaperon-ähnliche Aktivität entscheidend, die in der amino- und carboxy-terminalen Region des Proteins lokalisiert ist. Diese Kerndomäne von SurA hat strukturelle Ähnlichkeit sowohl mit der C-terminalen Haken-ähnlichen Bindedomäne der cytosolischen PPIase und Chaperon Trigger Faktor (TF) aus *Escherichia coli* [Ferbitz *et al.*, 2004; Maier *et al.*, 2005; Stirling *et al.*, 2006], als auch mit dem hypothetischen Protein MPN555 aus *Mycoplasma pneumoniae* [Schulze-Gahmen *et al.*, 2005]. TF verfügt über eine N-terminale Ribosomen-Bindestelle, eine zentrale PPIase-Domäne und zwei C-terminale „Arm“-Domänen, welche an naszierende Proteine am Ribosomen-Ausgang binden [Ferbitz *et al.*, 2004; Merz *et al.*, 2006]. Die Chaperonaktivität wurde im C-Terminus von TF lokalisiert [Merz *et al.*, 2006]. MPN555 ist ein putatives Homolog zu TF, besitzt jedoch keine PPIase-Domäne [Schulze-Gahmen *et al.*, 2005].

Die Kristallstruktur von SurA stellt eine einer „asymmetrischen Hantel“ ähnelnde räumliche Struktur dar [Bitto and McKay, 2002]. Die Kerndomäne besteht aus der amino- und der carboxy-terminalen Region, sowie der PPIase-inaktiven Parvulin-Domäne I. Hierbei stellt die carboxy-terminale Helix ein elementares, stabilisierendes Strukturelement dar [Behrens *et al.*, 2001]. Als so genannte Satellitendomäne ist die PPIase-aktive Parvulin-Domäne II über zwei langgestreckte Peptidlinker mit der Kerndomäne verbunden (Abb. 4b). Eine Peptidinteraktion mit dem N-Terminus von SurA ist nachgewiesen worden [Webb *et al.*, 2001]. Daher ist zunächst eine mögliche Substratbindestelle der Chaperonfunktion in einem Spalt, der sich durch die Kerndomäne zieht und in dem sich ein Polypeptid einlagern könnte, vermutet worden [Bitto and

EINLEITUNG

McKay, 2002]. Mittlerweile ist eine Substratbindestelle in der Parvulin-Domäne I (SurAI) detektiert worden. Es wird vermutet, dass diese Domäne für die Substratselektion und das SurANICt-Modul für die Chaperonaktivität zuständig sind [Xu *et al.*, 2007]. Daher wird dieser Bereich in SurA im weiteren Verlauf als Chaperon-Modul bezeichnet werden. Diese potentielle Substratbindestelle in SurAI ist kristallographisch mit einem artifiziellen Peptid PepC dargestellt worden. Es ist nicht möglich gewesen eine Struktur des SurA-Gesamtproteins mit gebundenem Peptid zu erhalten, aus diesem Grund ist das SurANICt-Protein verwendet worden. Bei diesem handelt es sich um eine Variante, bei der die PPIase-aktive Parvulin-Domäne II deletiert worden ist (Abb 4c-d). In der Struktur wurde ein Dimer aus zwei SurANICt-Untereinheiten erhalten, welche das Peptid PepC von beiden Seiten durch die Parvulin-Domäne I binden ([Xu *et al.*, 2007], siehe Abb 4e-g). Bei dem Peptid PepC handelt es sich um ein artifizielles Peptid, welches mittels *phage display* detektiert worden ist. In der Struktur weist dieses eine helikale Form auf. Strukturelle Darstellungen SurANICt-PepC-Komplexes sind in Abb. 4e-g aus verschiedenen Blickwinkeln zusammengefasst.

Die durch die Bindung der Peptides PepC resultierende Dimerisierung der isolierten Parvulin-Domänen I ist nicht auf eine direkte Interaktion zwischen den Parvulin-Domänen zurück zu führen, sondern nur durch die Bindung des Peptides PepC verursacht [Xu *et al.*, 2007]. In der Kristallstruktur des SurANICt-PepC-Komplexes gibt es auch Kontaktstellen zwischen den beiden SurA-Proteinen. Diese sind vor allem in den Bereichen der C-terminalen Helix, sowie der Helix 6 und Helix 3 des N-Terminus zu finden.

Auch für das Parvulin Par27 aus *Bordetella pertussis* wurde eine Dimerisierung nachgewiesen. Damit war Par27 das erste identifizierte Parvulin, welches Dimere in Lösung bildet [Hodak *et al.*, 2008]. Hierbei bildet Par27 symmetrische Homodimere, bei denen die amino- und carboxyterminalen Enden eine wiegenförmige Kernstruktur ausbilden [Clantin *et al.*, 2010]. Vergleichbar zu SurA besitzt Par27 *in vitro* PPIase- und Chaperon-Aktivität und eine hohe Affinität für Proteine mit vielen amphipathischen β -Strukturen, wie sie in OMPs vorkommen [Hodak *et al.*, 2008]. Insgesamt weist Par27 durchaus strukturelle Ähnlichkeiten zu SurA und TF auf. Diese befinden sich jedoch nur im Bereich der N- und C-terminalen Chaperon-Domäne, die weiteren Domänen weisen keine Sequenz-Ähnlichkeiten auf. Zusätzlich unterscheidet sich Par27 in der Topologie des Dimers nach der Peptidbindung [Clantin *et al.*, 2010].

SurA ist im periplasmatischen Raum an der Reifung der Porine von *E. coli* beteiligt, was sich dahingehend zeigt, dass *surA*-Mutanten pleiotrope Phänotypen aufweisen. Das Fehlen von SurA führt zur Störung der Reifung der Porine [Lazar and Kolter, 1996]. Daraus resultiert eine verringerte Porinkonzentration in der äußeren Membran und folglich eine instabile Zellhülle. Dies äußert sich in einer erhöhten Sensitivität gegenüber hydrophoben Agenzien und Antibiotika. In *surA*-Mutanten ist durch die Akkumulation periplasmatischer Porinfaltungsintermediate zudem die σ^E -abhängige Stressantwort konstitutiv induziert [Missiakas *et al.*, 1996; Rouviere and Gross, 1996].

Dem Chaperon SurA scheint somit eine der Hauptrollen im Prozess der Porinreifung zuzukommen, wobei alle bisherigen Daten auf eine Spezialisierung von SurA auf die Reifung von Außenmembranproteinen hindeuten [Lazar and Kolter, 1996; Behrens *et al.*, 2001; Rizzitello *et al.*, 2001; Bitto and McKay, 2003; Hennecke *et al.*, 2005b; Sklar *et al.*, 2007b].

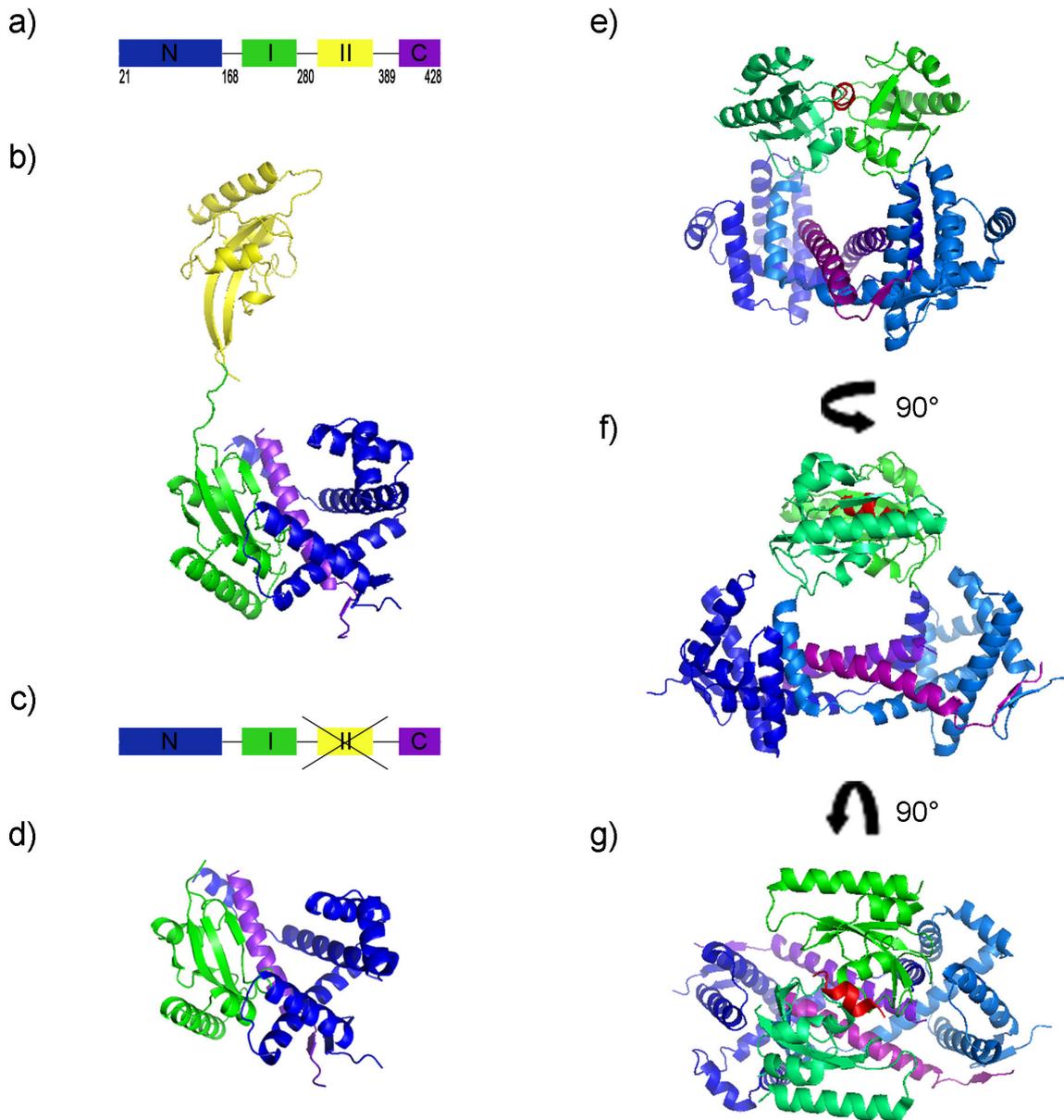


Abb. 4: Darstellung des periplasmatischen Chaperons SurA aus *Escherichia coli*. **a)** Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von SurA (modifiziert nach [Bitto and McKay, 2002]). Das reife SurA-Protein beginnt mit der Aminosäure 21. Die ersten 20 Aminosäuren bilden das Signalpeptid, welches beim Übergang vom Cytoplasma zum Periplasma entfernt wird. Die Zahlen in der schematischen Darstellung beziehen sich auf den Beginn des N-Terminus, die Mitte der Verbindungsstücke zwischen den Domänen und das Ende des C-Terminus. N = amino-/N-terminale Region; I = Parvulin-Domäne I (keine detektierbare PPIase-Aktivität); II = Parvulin-Domäne II (PPIase-Aktivität); C = carboxy/C-terminale Region. **b)** Kristallstruktur des SurA-Proteins ([Bitto and McKay, 2002]; PDB ID, 1M5Y). Die Farben der Struktur entsprechen der farblichen Darstellung des modularen Aufbaus aus a. Die Kerndomäne aus N- und C-Terminus, sowie der Parvulin-Domäne I bildet einen Spalt, in dem sich ein Polypeptid einlagern könnte. **c) & d)** Schematische und strukturelle Darstellung des modularen Aufbaus von SurANICt modifiziert nach [Bitto and McKay, 2002] (PDB ID: 1M5Y). Bei dieser SurA-Variante handelt es sich um die Kerndomäne des SurA-Proteins, da hier die satellitenhafte PPIase-aktive Parvulin-Domäne II des SurA-Proteins deletiert worden ist. **e)** Strukturelle Darstellung des Komplexes aus zwei SurANICt-Untereinheiten mit gebundenem Peptid PepC modifiziert nach [Xu *et al.*, 2007] (PDB ID: 2PV3). Die SurANICt-Untereinheit #1 ist farblich dargestellt wie in Abb. c, die zweite SurANICt-Untereinheit ist dargestellt in hellblau, mint und pink. Das artifizielle Peptid PepC weist eine helikale Struktur auf (rot). **f)** Drehung von Abb. e um 90° gegen den Uhrzeigersinn. **g)** Drehung von Abb. f um 90° nach vorn.

EINLEITUNG

Dabei scheint SurA an mehreren Schritten des Porinreifungswegs mitzuwirken und eine zentrale Stellung bei der Transformation der ungefalteten Proteine in einem faltbaren Zustand inne zu haben [Hagan *et al.*, 2010]. Es ist gezeigt worden, dass SurA an der Konversion des ungefalteten zum gefalteten Monomer, einem frühen Schritt der Porinreifung, beteiligt ist [Rouviere and Gross, 1996]. Eine Assoziation des SurA-Proteins mit der äußeren Membran deutet darauf hin, dass SurA auch an späteren, membranassoziierten Schritten der Porinreifung beteiligt ist [Hennecke *et al.*, 2005b]. Ebenso ist eine direkte Interaktion von substratgebundenem SurA mit BamA, dem zentralen Protein des BAM-Komplexes (siehe auch Abschnitt 1.4), nachgewiesen worden [Sklar *et al.*, 2007b; Vuong *et al.*, 2008]. In Abwesenheit der Proteine SurA und BamA erhält man ähnliche Phänotypen, was auf eine ähnliche, jedoch nicht redundante Funktion dieser beiden Proteine bei der Biogenese der OMPs schließen lässt [Ureta *et al.*, 2007].

Die Reifung periplasmatischer Proteine bleibt durch das Fehlen von SurA unbeeinflusst [Lazar and Kolter, 1996]. SurA bindet an *in vitro* neu-synthetisierte Porine mit bis zu 500-fach höherer Effizienz als an *in vitro* neu-synthetisierte cytoplasmatische oder periplasmatische Proteinen vergleichbarer Größe [Behrens *et al.*, 2001]. Analysen der Substratspezifität haben schließlich gezeigt, dass SurA bevorzugt Peptide mit spezifischen Mustern aromatischer Aminosäuren, insbesondere der Motive aromatisch-aromatisch (*Ar-Ar*) oder aromatisch-beliebig-aromatisch (*Ar-X-Ar*), bindet [Bitto and McKay, 2003; Hennecke *et al.*, 2005b]. Dieses Aminosäure-Motiv ist häufiger in integralen Proteinen der äußeren Membran als in anderen Proteinen zu finden. Die räumliche Ausrichtung der Aminosäureseitenketten scheint ebenfalls von Bedeutung zu sein, denn SurA bindet bevorzugt Peptide, in denen die aromatischen Seitenketten gleich- bzw. gegenständig ausgerichtet sind [Hennecke *et al.*, 2005b]. Diese Anordnung ist hauptsächlich in β -Strängen zu finden, die ebenfalls ein charakteristisches und häufiges Strukturelement integraler Proteine der äußeren Membran sind [Koebnik *et al.*, 2000].

Zu diesen integralen Proteinen der äußeren Membran gehören OmpA, OmpF, OmpC und LamB und es ist nachgewiesen worden, dass SurA an deren Biogenese beteiligt ist [Rouviere and Gross, 1996; Sklar *et al.*, 2007b]. Es wurde gezeigt, dass die Assemblierung von LamB effizienter durch SurA, als durch Skp/DegP erfolgt [Sklar *et al.*, 2007b]. Die β -Fass Außenmembran-Protease OmpT [Kramer *et al.*, 2000] enthält mehrere putative SurA-Bindestellen [Mogensen and Otzen, 2005; Xu *et al.*, 2007] und ist ebenfalls ein SurA-Substrat [Hagan *et al.*, 2010].

Im Gegensatz hierzu hängt die Insertion des ebenfalls β -Fassartigen Außenmembranproteins TolC nicht von SurA ab [Werner *et al.*, 2003]. Die könnte durch seinen Aufbau aus drei Untereinheiten begründet sein [Koronakis *et al.*, 2000]. Bisher ist auch noch keine Präferenz der OMPs für das periplasmatische Chaperon Skp nachgewiesen worden. Insgesamt deutet vieles darauf hin, dass SurA das primäre Chaperon für den Transport einer großen Anzahl von OMPs zur äußeren Membran ist [Rizzitello *et al.*, 2001; Sklar *et al.*, 2007b].

SurA eskortiert auch das Protein LptD (vormals Imp) durch das Periplasma bis zum BAM-Komplex in der äußeren Membran und scheint das bevorzugte Chaperon für diesen Prozess zu sein [Vertommen *et al.*, 2009]. LptD gehört zu den essentiellen beta-Fass-Proteinen, da es für die Insertion der LPS in die äußere

Membran benötigt wird [Braun and Silhavy, 2002; Wu *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2008; Sperandio *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2009]. Die Insertion von LPS erfolgt im Zusammenspiel mit dem Lipoprotein LptE [Bos *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005]. Die Gene *lptD* und *surA* liegen zusammen in einem Operon, welches unter den Gram-negativen Bakterien hoch-konserviert ist. Kommt es zu einer Mutation in *lptD* und daraus resultierend zu einem niedrigen Expressions-Level des *lptD*-Gens, so weisen diese Bakterienzellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber kleinen, toxischen Molekülen auf [Abe *et al.*, 2003], welche durch eine verringerte Integrität der äußeren Membran begründet ist [Ruiz and Silhavy, 2005]. Aus diesem Grund könnten die beobachteten Außenmembrandefekte einer *surA*-Mutante eher indirekter Natur, durch die verminderten LptD Level, als auf den Verlust der Chaperon-Aktivität von SurA zurückzuführen sein [Vertommen *et al.*, 2009].

1.6 Einfluss von SurA auf die Pathogenese von *E. coli*

Die Funktion von SurA ist ebenfalls an die Pathogenese gekoppelt und hat einen Einfluss auf die Virulenz pathogener Bakterien. Homologe des SurA-Proteins sind innerhalb der Bakterienwelt, aber nicht in Eukaryoten, relativ weit verbreitet und verfügen über eine hoch-konservierte Sequenz [Alcock *et al.*, 2008]. So ist bspw. kürzlich auch das hypothetische Protein LIC 12922 als ein SurA-Homolog in *Leptospira interrogans* identifiziert worden. Dieses besitzt keine nachweisbare PPIase-Aktivität, weist jedoch in der NC-Domäne strukturelle Ähnlichkeiten zu TF und SurA auf [Giuseppe *et al.*, 2011].

Der Einfluss von SurA auf die Virulenz ist u.a. daran gezeigt worden, dass *surA*-Mutanten des Bakteriums *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in ihrer Fähigkeit in eukaryotische Zellen einzudringen eingeschränkt sind [Sydenham *et al.*, 2000; Tamayo *et al.*, 2002]. Des Weiteren verfügt der *surA*-defiziente, uropathogene *E. coli*-Stamm UTI89 nicht mehr über das Potenzial, sich effektiv an Blasenepithelzellen anzuheften und in diese einzudringen [Justice *et al.*, 2006]. SurA ist auch wichtig für das Wachstum und das Überleben uropathogener *E. colis* innerhalb der Wirtszelle. So ist SurA an der Biogenese der für die Assemblierung der Typ 1- und Typ P-Fimbrien beteiligten Proteine FimD und PapC beteiligt [Justice *et al.*, 2005]. Typ 1-Fimbrien werden sowohl für die effiziente Anheftung und Invasion des Wirts, als auch für die Formierung von intrazellulären Bakteriengemeinschaften (*intracellular bacterial communities*, ICBs) benötigt [Mulvey *et al.*, 1998; Justice *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007]. ICBs sollen dazu dienen die eingedrungenen Bakterien vor der Immunantwort des Wirts zu schützen. Von einer UTI89 *surA*-Mutante können diese ICBs nicht mehr gebildet werden [Anderson *et al.*, 2003].

Weiterhin ist eine Beteiligung von SurA an der Biogenese des Adhäsins Intimin und der Protease Autotransporter Proteine EspP und Hbp enteropathogener und enterohämorrhagischer *E. coli* [Bodelon *et al.*, 2009; Ieva and Bernstein, 2009; Ruiz-Perez *et al.*, 2009; Sauri *et al.*, 2009] nachgewiesen worden. In dem fakultativ intrazellulären Pathogen *Shigella flexneri* führt eine Mutation des *surA*-Gens durch die mangelnde Präsentation des IcsA Autotransporters an der Zelloberfläche zu einem Defekt der Infektiosität [Purdy *et al.*, 2007].

Das Fehlen von SurA und die damit einhergehende Akkumulierung von OMP-Faltungsintermediaten im Periplasma führt zur Induktion der σ^E extra-cytoplasmatischen Stressantwort [Missiakas *et al.*, 1996;

Rouviere and Gross, 1996] und des RcsCBD Phosphorelay Signalwegs [Castanie-Cornet *et al.*, 2006]. Das *surA*-Gen wird durch beide Signalwege positiv reguliert [Dartigalongue *et al.*, 2001; Ferrieres and Clarke, 2003; Rhodius *et al.*, 2006]. Der alternative Sigmafaktor σ^E induziert die Transkription von kleinen RNAs und verringert auf diese Weise die Transkript-Level der Gene der OMPs und dadurch auch die Proteinlevel der OMPs in der äußeren Membran [Johansen *et al.*, 2006; Vogel and Papenfort, 2006]. Zusätzlich soll die σ^E induzierte Stressantwort ebenfalls bei der Anpassung an die durch die Interaktion mit dem Wirt resultierenden Gegebenheiten involviert sein, da σ^E -defiziente Zellen eine mangelhafte Pathogenität aufweisen [Raivio, 2005; Rhodius *et al.*, 2006]. Der RcsCBD Phosphorelay Signalweg reguliert die zeitliche Abfolge der normalen Biofilm-Bildung [Huang *et al.*, 2006]. Daher ist durch die gleichzeitige Aktivierung beider Signalwege in einer *surA*-Mutante die effektive Anpassung an den Wirt, sowie die Kolonisierung und das Verbleiben innerhalb der Wirtszelle gestört.

Basierend auf diesen oben genannten Erkenntnissen ist die weitere Aufklärung der Funktionsweise von SurA und damit verbunden die Ermittlung möglicher weiterer Substratbindungsstellen im Protein, auch im Hinblick auf eine Nutzung als ein potentiell wirkstofftarget in Gram-negativen pathogenen Bakterien notwendig.

1.7 Problemstellung und Einleitung in die Versuche

Erste Hinweise auf eine Bindungsstelle zur Substraterkennung in der Parvulin-Domäne I sind 2007 erhalten worden [Xu *et al.*, 2007]. In proteinkristallographischen Studien wurde die Interaktion des artifiziellen Peptids PepC mit der SurA-Variante SurANICT, die um die PPIase-aktive Parvulin-Domäne II deletiert ist, untersucht. Bei Bindung dieses Peptides kam es zur Formierung eines SurANICT:PepC-Dimers, wobei das Peptid PepC zwischen zwei Parvulin-Domänen I gebunden wurde.

Da es sich bei dem verwendeten Peptid um ein artifizielles Peptid aus einem *phage display* handelte, stellte sich die Frage, ob auch biologisch relevante, natürliche Peptide an dieser postulierten Substratbindestelle in der Parvulin-Domäne I von SurA binden. Aus Gründen der Durchführbarkeit und Vergleichbarkeit wurden Peptide vergleichbarer Länge hierfür ausgewählt. Da das SurA-Protein auch ohne die Parvulin-Domäne I *in vivo* funktionstüchtig ist, sollte auch untersucht werden, ob und wo es noch weitere Substratbindestellen innerhalb von SurA gibt.

Diesen Fragen soll in ESR-spektroskopischen Untersuchungen des SurA-Gesamtproteins, sowie seiner isolierten Parvulin-Domäne I in Anwesenheit von Peptiden natürlicher Substrate von SurA nachgegangen werden. Die zu verwendeten Peptidsequenzen werden aus einer Peptidbibliothek des Außenmembranproteins LamB ausgewählt, die in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe auf ihre Bindung von SurA untersucht wurden [Hennecke, 2006]. Die ESR-Spektroskopie wurde verwendet, da diese Methode schon erfolgreich für ähnliche Studien mit anderen Proteinen eingesetzt worden ist. Die Interaktion von SurA mit Peptiden wird bei dieser Methode durch die spezifischen Änderungen des Mobilitätsspektrums der Radikalsonde MTSSL, die zuvor ortsspezifisch in SurA eingeführt wird, nachgewiesen.

EINLEITUNG

Im zweiten Versuchsteil soll mit Hilfe eines genetischen Indikatorsystems überprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Substratbindung an die Parvulin-Domäne I und der zuvor in der Arbeitsgruppe beobachteten *in vivo*-Oligomerisierung von SurA gibt. Weiterhin soll getestet werden, ob die in den kristallographischen Strukturen beobachteten Kontakte der SurA-Proteine auch *in vivo* eine Rolle spielen und ob die PPIase-aktive Parvulin-Domäne II ebenfalls Substrat bindet. Das hierfür verwendete ToxR-System war ebenfalls schon in der Arbeitsgruppe etabliert.

Da in den ESR-spektroskopischen Untersuchungen nur kurze Peptide von 12 – 14 Aminosäuren Länge verwendet wurden, stellte sich ferner die Frage, wie und wo längere OMP-Polypeptide mit dem Chaperon-Modul des SurA-Proteins interagieren. Hierfür sollte im dritten Versuchsteil die Methode der photoaktivierbaren, ortsspezifischen Quervernetzung von OMP-Polypeptiden mit dem SurA-Protein in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Bei dieser Methode wird die unnatürliche Aminosäure ρ BPA ortsspezifisch in das SurA-Protein integriert. Befinden sich OMP-Polypeptide in unmittelbarer Nähe zu ρ BPA, so können diese durch UV-Bestrahlung kovalent an die unnatürliche Aminosäure gebunden werden. Ziel war es, zunächst die Grundlagen für die Methodik der photoaktivierbaren, ortsspezifischen Quervernetzung zu legen.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

Tab. 1: Liste der verwendeten Bakterienstämme

Stammbezeichnung	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	[<i>endA1 hsdR17 (r^km^k)</i> , <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA(Naf)</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15]	[HANAHAN, 1983]
SB44452	<i>P_{LacO-1-surA} Δskp zae-3095::Tn10Km</i>	Laborsammlung
FHK12	F' <i>lacI^q lacZ ΔM15 proA⁺B⁺ ara Δ(lac-proAB) rpsL 80dlacΔM15 attB::(bla, ctx::lacZ)</i> , Ap ^R	[KOLMAR ET AL., 1995]
FHKs	FHK12 <i>surA::km</i>	Diese Arbeit
SB44102 = YM10105	MC4100 <i>surA::Tn10dCm slyD1 zhd26::Tn10</i> , Cm ^R , Tc ^R	[Behrens et al., 2001]
SB44097	MC4100 <i>slyD1 zhd26::Tn10</i> , Tc ^K	[Roof et al., 1994]
YM10219	SB44097 <i>surA::km</i>	Diese Arbeit
TOP10	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen (One Shot [®] Chemically Competent <i>E. coli</i>)

2.2 Vektoren

Tab. 2: Liste der verwendeten und neu-generierten Vektoren

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pASK75	Expressionsvektor, P/O _{tet} , ColEI ori, Ap ^K	[SKERRA, 1994]
pASKSurA	<i>surA</i> -Gen in pASK75, Ap ^R	[BEHRENS ET AL., 2001]
pASKSurASacl	pASKSurA mit <i>SacI</i> -Restriktionstelle am Beginn des N-Terminus, Ap ^R	Laborsammlung
pASKcSurAl	<i>surAl</i> -Gen ohne Signalpeptid in pASK75, Ap ^K	Laborsammlung
pQE60	C-His ₆ Expressionsvektor, P _{T5} /O _{lac} , ColEI ori, Ap ^R	Qiagen
pQESurASac	<i>surA</i> -Gen in pQE60, <i>SacI</i> -Schnittstelle hinter der Sequenz, die für das Signalpeptid kodiert, Ap ^R	
pKD46	Red Rekombinase Expressionsplasmid, Ap ^K	[Datsenko and Wanner, 2000]
ESR-Spektroskopie:		
pASKSurASacl_H68C	H68C-Mutation in pASKSurASacl, Ap ^R	Laborsammlung
pASKSurASacl_H68C-Thrombin-His	H68C-Mutation in pASKSurASacl mit einer Thrombin-Schnittstelle vor dem His-tag, Ap ^R	Laborsammlung
pASKSurA_Q223C	Q223C-Mutation in pASKSurA, Ap ^R	Laborsammlung
pASKSurA_N227C	N227C-Mutation in pASKSurA, Ap ^R	Laborsammlung

MATERIAL

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pASKcSurAI_Q191C	Q191C in pASKcSurAI, Ap ^R	Diese Arbeit
pASKcSurAI_D211C	D211C in pASKcSurAI, Ap ^R	Diese Arbeit
pASKcSurAI_Q223C	Q223C in pASKcSurAI, Ap ^R	Diese Arbeit
pASKcSurAI_M231C	M231C in pASKcSurAI, Ap ^R	Diese Arbeit
pASKcSurAI_E238C	E238C in pASKcSurAI, Ap ^R	Diese Arbeit
pASKcSurAI_V263C	V263C in pASKcSurAI, Ap ^R	Diese Arbeit
Ortsspez. Quervernetzung:		
pASKSurA_K86amber	K86amber-Mutation in pASKSurA, Ap ^K	Diese Arbeit
pASKSurA_Y128amber	Y128amber-Mutation in pASKSurA, Ap ^R	Diese Arbeit
pASKSurA_E135amber	E135amber-Mutation in pASKSurA, Ap ^R	Diese Arbeit
pASKSurA_M231amber	M231amber-Mutation in pASKSurA, Ap ^R	Diese Arbeit
pASKSurA_L239amber	L239amber-Mutation in pASKSurA, Ap ^R	Diese Arbeit
pASKcSurAI_M231amber	M231amber-Mutation in pASKcSurAI, Ap ^K	Diese Arbeit
pASKcSurAI_L239amber	L239amber-Mutation in pASKcSurAI, Ap ^R	Diese Arbeit
pEVOL- <i>pBpF</i>	unnatural aaRS & tRNA _{CUA} , Einfügen der unnatürlichen Aminosäure <i>pBPA</i> , Arabinose-induzierbar, Cm ^R	Schultzes Lab, USA [Young <i>et al.</i> , 2010]
pPER99	<i>lamB</i> -Gen in pKK223-3, Ap ^K	[Rouviere and Gross, 1996]
pEXP5-CT/TOPO	TOPO-TA [®] -basierter Expressions- und Klonierungsvektor, T7-Promotor <i>His-tag</i> , Ap ^R	Invitrogen
pEXP5-CT/PLStrep	<i>lamB</i> -Fragment PL mit <i>Strep-tagII</i> in pEXP5-CT/TOPO, Ap ^R	Diese Arbeit
pEXP5-CT/LPLStrep	<i>lamB</i> -Fragment LPL mit <i>Strep-tagII</i> in pEXP5-CT/TOPO, Ap ^R	Diese Arbeit
pASKMalEStrep	<i>malE</i> -Gen mit C-terminalem <i>Strep-tagII</i> in pASK75, Ap ^R	Laborsammlung
pTOPOTolCSD7	<i>tolC</i> -Gen in pCR4-TOPO (Invitrogen), Ap ^R , Km ^R	Laborsammlung
pCR [®] 2.1-TOPO	TOPO-TA [®] -Klonierungsvektor; Ap ^R , Km ^R	Invitrogen
ToxR-Assay:		
pHK Vektor-Serie	Expressionsvektor für ToxR-Assays; <i>P/OtoxR</i> , F1 ori, ColE1 ori, Cm ^R	[Kolmar <i>et al.</i> , 1994]
pHKToxR'MalE	<i>toxR'malE</i> -Fusionsgen in pHK, Cm ^K	[Kolmar <i>et al.</i> , 1995]
pHKToxR'MalEGCNa	<i>toxR'malEGCN</i> -Fusionsgen in pHK, Cm ^R	[Kolmar <i>et al.</i> , 1995]
pHKToxR'SurA	<i>toxR'surA</i> -Fusionsgen in pHK, Cm ^R	Laborsammlung
pHKToxR'SurAI	<i>toxR'surAI</i> (isolierte Parvulin-Domäne I)-Fusionsgen in pHK, Cm ^R	Laborsammlung
pHKToxR'SurAI+II	<i>toxR'surAI+II</i> (Fusion von Parvulin-Domäne I und Parvulin-Domäne II)-Fusionsgen in pHK, Cm ^R	Laborsammlung
pHKToxR'SurANcT	<i>toxR'surANcT</i> (Chaperon Modul)-Fusionsgen in pHK, Cm ^R	Laborsammlung
pHKToxR'SurANICt	<i>toxR'surANICt</i> (Konstrukt ohne die Parvulin-Domäne II)-Fusionsgen in pHK, Cm ^R	Laborsammlung
pHKToxR'SurANIICt	<i>toxR'surANIICt</i> (Konstrukt ohne die Parvulin-Domäne I)-Fusionsgen in pHK, Cm ^R	Laborsammlung

2.3 Peptide

Tab. 3: Liste der in der ESR- und in der Fluoreszenz-Spektroskopie verwendeten Peptide

Peptidname	Aminosäuresequenz	Motiv	Herkunft	Vorhergesagte Affinität	Referenz
<u>unmarkiert</u>					
Pep46	DVHMIDFYWDISC	AxA	LamB	starker Binder	[Hennecke <i>et al.</i> , 2005b]
Pep54	GVATYRNSNFFGL	AA	OmpF	starker Binder	[Hennecke, 2006]
Pep71	TLELGVVDYGRANL	none	LamB	kein Binder	[Hennecke <i>et al.</i> , 2005b]
Pep95	LLVAQYQDFDGLR	AxA	OmpF	starker Binder	[Hennecke, 2006]
PepC	NFTLKFWDIFRK	AA	künstlich	spezifischer Binder	[Xu <i>et al.</i> , 2007]
<u>markiert</u>					
Pep46-IAANS	DVHMIDFYWDISCB	AxA	LamB	starker Binder	[Hennecke, 2006]

2.4 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker

Die verwendeten Längenstandards und Molekulargewichtsmarker wurden alle bei der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) gekauft.

2.4.1 DNA-Längenstandards

Lösungen von DNA-Längenstandards wurden mit H₂O_{dd} und Sucrosefarbmarker auf eine DNA-Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt und bei 4°C gelagert.

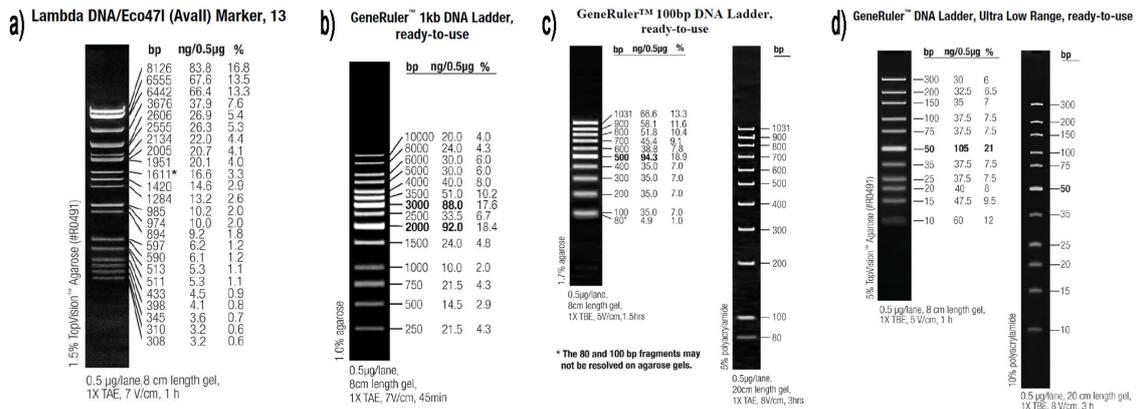


Abb. 5: Darstellung der DNA-Längenstandards. a) Lambda DNA/Eco471 (Avall) Marker, 13 (Fermentas #SM1051), b) GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas #SM0313), c) GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas #SM0243) und d) GeneRuler™ DNA Ladder, Ultra Low Range, ready-to-use (Fermentas #SM1213).

2.4.2 Molekulargewichtsmarker für Proteine

Die Lösungen der Molekulargewichtsmarker waren fertig angesetzt und konnten direkt benutzt werden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

MATERIAL

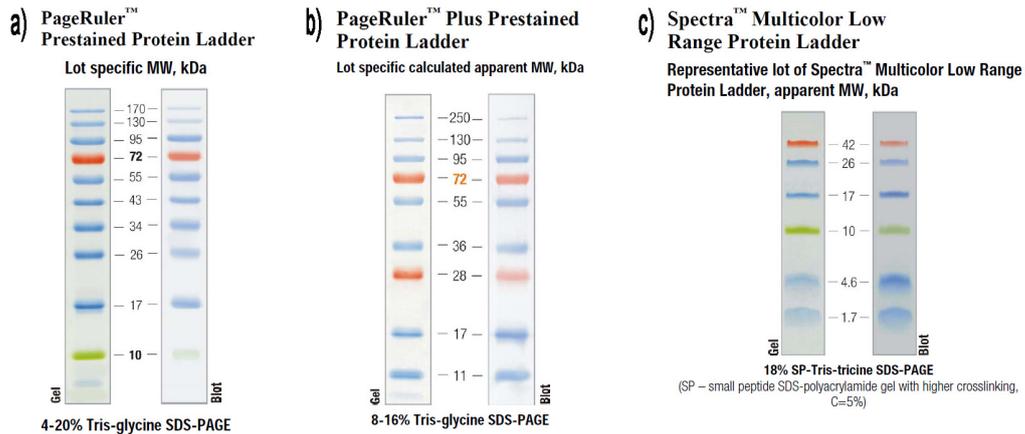


Abb. 6: Darstellung der Molekulargewichtsmarker. a) PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas #SM0671), b) PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas #SM1811) und c) Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (Fermentas #SM1861)

2.5 Oligodesoxyribonukleotide

2.5.1 Oligodesoxyribonukleotide für die Amplifikation mittels PCR

Tab. 4: Oligodesoxyribonukleotide für die Amplifikation mittels PCR

Bezeichnung	T _M [°C]	Sequenz (5' – 3')
<u>Amplifikation ohne Einführung von Mutationen</u>		
YMLamB1	52,4	ATGAAGA <u>ACT</u> GGAAAACGC
YMLamB2	54,5	GCTTATTTTTCGAACTGCGG
YMLamB3	56,5	ATGATGATTACTCTGCGCAAAC
YMLamB4	56,7	GCTACTGCAGCCAGATTTC
<u>Amplifikation mit Einführung einer Mutation</u>		
Pep46_Sacfor_new	64,4	GCTTCTACGAGCTCCATGACGTT <u>C</u>
P46-LPst_rev_new	69,6	GAACCACCCGCCTGCAGGGAGC
L-Pep46Sacfor	63,0	GAAGCAAACGAGCTCGGTAAAAAC <u>C</u>

2.5.2 Oligodesoxyribonukleotide für die Sequenzierung

Tab. 5: Oligodesoxyribonukleotide für die Sequenzierung

Bezeichnung	T _M [°C]	Sequenz (5' – 3')
M13U	52,8	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R	51,4	GGAAACAGCTATGACCAT
SuPst	56,5	GATCATGGATCAAATCATCCTG

2.5.3 Oligodesoxyribonukleotide für die Mutagenese

Die Position des mutagenisierten Basen-Triplets ist unterstrichen.

MATERIAL

Tab. 6: Primer für die Cystein-Mutagenese (benötigt für ESR-Experimente)

Bezeichnung	T _M [°C]	Sequenz (5' – 3')
<u>Parvulin-Domäne I</u>		
Q191Cfor	60,6	GACCTCTGATT <u>TGTGTGAACGAAG</u>
Q191Crev	60,6	CTTCGTTCAC <u>ACAATCAGAGGTC</u>
D211Cup	61,4	CGGCGCTT <u>GTTTCGGTAAGC</u>
D211Clo	61,4	GCTTACCGAA <u>ACAAGCGCCG</u>
Q223Cup	71,0	CATTCTGCCGACT <u>GCCAGGCGCTGAAC</u>
Q223Clo	71,0	GTTTCCAGCGCT <u>GCCAGTCCGGCAGAATG</u>
M231Cup	69,6	GGCGGCCAGT <u>TGTGGCTGGGG</u>
M231Clo	69,6	CCCCAGCCACACTGGCCGCC
E238Cup	61,8	CGTATTCAGT <u>GTTTGCCCGGG</u>
E238Clo	61,8	CCCGGGCAAACACTGAATACG
V263Cup	66,3	CGTTCCGGCT <u>TGTGGCTTCCATATTC</u>
V263Clo	66,3	GAATATGGAAGCC <u>ACAGCCGGAACG</u>

Tab. 7: Lokalisierung der Mutationen und Primersequenzen für QC-PCR (für ToxR-Experimente)

Bezeichnung	T _M [°C]	Sequenz (5' – 3')
<u>Parvulin-Domäne I</u>		
M231Rup	71,7	GGCGGCCAGAGGGGCTGGGG
M231Rlo	71,7	CCCCAGCC <u>CTCTGGCCGCC</u>
L239Dup	66,0	GTATTCAGGAGG <u>ACCCCGGGATC</u>
L239Dlo	64,9	GATCCCGGGT <u>CTCCTGAATAC</u>
F243Dup	69,6	GCCCGGGATCGACGCCCAGG
F243Dlo	69,6	CCTGGGCGT <u>CGATCCCGGGC</u>
V263Rup	67,9	CGTTCCGGCC <u>TGGCTTCCATATTC</u>
V263Rlo	67,9	GAATATGGAAGCC <u>ACGGCCGGAACG</u>
L239DF243Dup	75,6	CAGGAGG <u>ACCCCGGGATCGACGCCCAG</u>
L239D F243Dlo	75,6	CTGGGCGT <u>CGATCCCGGGTCTCCTCTCT</u>
<u>Parvulin-Domäne II</u>		
L341Dup	69,6	GGCGGCGATGACGGCTGGGC
L341Dlo	69,6	GCCCAGCCG <u>TTCATCGCCGCC</u>
F349Dup	64,2	CACCAGATATTGACGATCCGGCC
F349Dlo	64,2	GGCCGGATCGTCAATATCTGGTG
F353Dup	69,6	CGATCCGGCCGACCGTGACGC
F353Dlo	69,6	GCGTCACGGT <u>CGGCCGGATCG</u>
<u>Chaperon-Modul</u>		
SH6M3F (Q155A E158A S159A)	81,2	CATCCTGCCGGCGGAAGTCGCAGCCCTGGCGCAGC
SH6M3R (Q155A E158A S159A)	81,2	GCTGCGCCAGGGCTGCGACTTCCGCCGGCAGGATG
D395Aup	64,0	GCGCAGAAAGCTCGTGCATAC
D395Alo	61,8	GGTATGCACGAGCTTTCTGCGC
M402Rup	64,0	CCGCATGCTGAGGAACCGTAAG
M402Rlo	64,0	CTTACGGT <u>TCTCAGCATGCGG</u>

MATERIAL

Tab. 8: Lokalisierung der Mutationen und Primersequenzen zur Einführung des *amber*-Stopcodons (für Quervernetzungs-Experimente)

Bezeichnung	T _M [°C]	Sequenz (5' – 3')
<u>Parvulin-Domäne I</u>		
Bpa_M231up	69,6	GGCGGCCAGT <u>AGGG</u> GCTGGGG
Bpa_M231Rlo	69,6	CCCCAGCCCT <u>ACT</u> GGCCGCC
Bpa_L239Dup	64,2	GTATTCAGGAGT <u>AG</u> CCCCGGGATC
Bpa_L239Dlo	64,2	GATCCCCGGGCT <u>ACT</u> CCTGAATAC
<u>Chaperon-Modul</u>		
Bpa_K86up	64,0	GATGGGGCAGT <u>AG</u> ATGGGAGTG
Bpa_K86lo	64,0	CACTCCCATCT <u>ACT</u> GCCCCATC
Bpa_Y128up	60,3	CTACAACACCT <u>AG</u> CGTAACCAG
Bpa_Y128lo	60,3	CTGGTTACGCT <u>AG</u> GTGTTGTAG
Bpa_E135up	63,9	CCAGATCCGCAAAT <u>AG</u> ATGATTATCTCTG
Bpa_E135lo	63,9	CAGAGATAATCATCT <u>AT</u> TTGCGGATCTGG

2.6 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tab. 9: Liste der verwendeten Chemikalien

Hersteller	Produktbezeichnung
AppliChem	Agar (für die Bakteriologie), BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylhydrogenphosphat-p-toluidin), Glycerin (87 %), MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure), NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid), Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat, Rubidiumchlorid, N-Laurosylsarcosin, Spectinomycin-Dihydrochlorid, TCEP (Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid), Tetracyclin-Hydrochlorid, Manganchlorid
Bachem	pBPA (<i>para</i> -benzoylphenylalanine (H-p-Bz-Phe-OH))
BD	Hefeextrakt
GE	Chelating Sepharose Fast Flow
Healthcare	
Hartenstein	DTT (Dithiothreitol/Clelands Reagent), Imidazol Pufferqualität, Isopropanol, Methanol, Natriumchlorid
Hartmann Analytic	L-Methionin [³⁵ S]
Millipore	Immobilon Western HRP Substrat
MP Biochem.	RNase Erase
New England Biolabs	Muriner RNase Inhibitor
PEQLAB	peqGOLD Universal Agarose
Perbio Science	DSS (Disuccinimidyl suberate)

MATERIAL

Hersteller	Produktbezeichnung
Roth	Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30), L-Alanin, Ammoniumacetat, Ampicillin Natriumsalz, D(+)-Biotin, Bromphenolblau Natriumsalz, Calciumchlorid-Dihydrat, Chloramphenicol, Trichlormethan/Chloroform, Coomassie Brilliant Blue R250, L-Cystein, DMF (Dimethylformamid), DMSO (Dimethylsuloxid), EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), Essigsäure (100 %), Ethanol, Ethidiumbromidlösung (1 %), α -D(+)-Glucose Monohydrat, L-Glutamin, Glycin, Harnstoff/Urea, HEPES, Hypoxanthin, IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid), Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydroxid-Plätzchen (KOH-Plätzchen), Kanamycinsulfat, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat, di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH-Plätzchen), Roti-Phenol (Phenol u. Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Pufferlösung pH 4 für Elektrode, Pufferlösung pH 7 für Elektrode, Salzsäure (32 %), SDS (Roti-Stock 20 %), L-Serin, Sucrose (D(+)-Saccharose), TCA (Trichloressigsäure), TEMED, Tris, Triton [®] X 100, Trypton/Pepton, Tween 20, Wasser DEPEC
Sigma-Aldrich	Ammoniumchlorid, APS (Ammoniumpersulfat), L-(+)-Arabinose, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, Casein Natriumsalz, Desoxynukleotide Set [100 mM], L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, Lysozyme (from chicken egg), L-Methionin, Nicotinamid, p-Aminobenzoessäure, p-Hydroxybenzoessäure, L-Prolin, Riboflavin (Vitamin B2), Rifampicin, L-Threonin, Thymidin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Valin, β -Mercaptoethanol
Thermo Scientific	Pierce ECL Westernblotting Substrate
VWR	Elektrolytlösung (Kaliumchlorid 3 M mit AgCl), Natriumacetat 3 x H ₂ O

2.7 Antikörper

Tab. 10: Liste der verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Charakteristika	Bezugsquelle
α -SurA	Primärantikörper aus dem Kaninchen polyklonales Antiserum gegen SurA	Eigene Arbeitsgruppe
Strep-tag [®] Antibody	Primärantikörper, anti-mouse IgG 2b Detektion von Strep-tag II	Qiagen
Tetra-His Antibody	Primärantikörper, anti-mouse IgG1 Detektion von 6x His-tags	Qiagen
Anti-MBP Antiserum	Primärantikörper aus dem Kaninchen Detektion des Maltose-bindenden Proteins (MBP, MalE)	New England Biolabs
α -rabbit-AP	Sekundärantikörper aus der Ziege, anti rabbit IgGs (whole molecule), AP konjugiert	Sigma-Aldrich
α -mouse-AP	Sekundärantikörper aus der Ziege, anti rabbit IgGs (whole molecule), AP konjugiert	Sigma-Aldrich
α -rabbit-HRP	Sekundärantikörper aus der Ziege, anti-rabbit IgG, Merretich-Peroxidase konjugiert	Dianova, Hamburg
α -mouse-HRP	Sekundärantikörper aus der Ziege, anti-rabbit IgG, Merretich-Peroxidase konjugiert	Dianova, Hamburg

2.8 Enzyme

Tab. 11: Liste der verwendeten Enzyme

Bezeichnung	Charakteristika	Hersteller
DNase 1	Desoxyribonuclease 1	AppliChem
Pfu Turbo DNA Polymerase	DNA-Polymerase	Stratagene
RNase A	Ribonuclease A	AppliChem
T4 DNA-Ligase	DNA-Ligase	New England Biolabs
Invi Taq Polymerase	DNA-Polymerase	Invitek
TopTaq Polymerase	DNA-Polymerase	Qiagen
Restriktionsenzyme	Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs/ Fermentas

2.9 Verwendete Kits

Tab. 12: Liste der verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
BigB Lysing Matrix, Tube	MP Biochemicals
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
ECL Western Blot Kit	GE Healthcare
Expressway TM Cell-Free <i>E. coli</i> Expression System	Invitrogen
Invisorb [®] Spin Plasmid Mini <i>Two</i>	Invitek
pEXP5-CT/TOPO [®] TA Expression Kit	Invitrogen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
PURExpress <i>in vitro</i> Protein Synthesis Kit	New England Biolabs
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

2.10 Sonstige Materialien und Geräte

Tab. 13: Liste der sonstigen verwendeten Materialien und Geräte

Materialie, Gerät	Bezeichnung, Hersteller
3 l-Schikanekolben	Glasgerätebau Ochs GmbH
Autoklav	Fedegari Autoklavi
Brutschränke (30°C und 37°C)	Heraeus electricons, CO ₂ belüftet
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektroporator	BioRad
Entwicklermaschine	Agfa, Curex 60
Feinwaage	Chyo JL-180
Fluoreszenzküvetten	Hellma
Fluoreszenz-Spektrophotometer	Spectrofluorophotometer RF-5301 PC, Shimadzu
Gel-Dokumentationsanlage	BioRad Gel Doc 2000
Gefrierschrank (-20°C)	Privileg Öko
Gefrierschrank (-80°C)	nunc
Gradientengele (SDS-PAGE)	Ready Gel [®] 10 – 20 % Tris-HCl, BioRad

MATERIAL

Materialie, Gerät	Bezeichnung, Hersteller
Graphitblotter	peqlab Biotechnologie GmbH
Grobwaage	Kern 470
Großzentrifuge	Avanti J-E, Beckman Coulter
Heizblock	Liebisch
Homogenisator	Fast Prep [®] -24, MP Biomedical
HPLC	ÄKTA Explorer, GE Healthcare
Kühlschrank	Privileg Öko
Kühlzentrifuge	Heraeus Multifuge 1 L-R
Magnetrührer	GLW M21
NanoDrop Spectrophotometer ND 1000	peqlab Biotechnologie GmbH
Netzgeräte	BioRad
PCR-Gerät	Biometra T3 Thermocycler
pH-Meter	WTW Multiline P4
Phosphor-Imager	FLA-2000, FujiFilm
Photometer	Amersham Biosciences
Pipetten	Eppendorf
Proteingelapparatur	BioRad Mini-Protean III Electrophoresis Cell
Schüttler	Certomat BS-1
Spritzenfilter	Millex [®] -HV Syringe Driven Filter Unit (PVDF), Millipore
Sterilwerkbank	Nunc Microflow
Thermoblock	Eppendorf Thermostat 5320
Tischzentrifuge	Heraeus-Biofuge
Ultraschallgerät	Bandelin Sonoplus HD70
Vortexer	Vortex Genie 2

2.11 Nährmedien zur Anzucht von *Escherichia coli* (Vollmedien)

LB (Luria Broth)-Medium	0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl
dYT-Medium	1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,6 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl

Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 120°C autoklaviert. Für feste Medien wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar *Bacteriological* (AppliChem) zugegeben. Antibiotika wurden aus den entsprechenden 1000-fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Kanamycin, 25 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Spectinomycin bzw. 10 µg/ml Tetrazyklin zugegeben.

2.12 Lösungen und Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit demineralisiertem Wasser (H₂O_{dd}) angesetzt.

Agarose-Lösung

1 % Agarose in 1 x TAE

MATERIAL

Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz), sterilfiltriert, Lagerung -20°C

AP (Alkalische Phosphatase)-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂

APS-Stammlösung

25 % Ammoniumpersulfat

BCIP

50 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidinsalz, wasserfrei) in 100 % DMF

Blocking-Puffer

Casein: 1 % (w/v) Casein in 1 x TBS, unter Erwärmen gerührt

Milchpulver: 3 % (w/v) fettarmes Milchpulver in 1 x TBST

Chloramphenicol-Stammlösung

25 mg/ml Chloramphenicol in 96 % Ethanol, Lagerung -20°C

Cloned Pfu DNA Polymerase Reaktionspuffer (10 x, Stratagene)

200 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM MgSO₄, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 1 % Triton® X-100,
1 mg/ml BSA (nukleasefrei)

Coomassie-Färbelösung

0,7 % Coomassie Brilliant Blue R-250 in Methanol wurde 1:1 mit 20 % Essigsäure gemischt

dNTP-Stammlösung für die PCR

10 mM

Ethidiumbromid-Färbelösung

100 µg/ml Ethidiumbromid in H₂O_{dd}

F-Puffer [Patzelt *et al.*, 2001]

20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA

Glucose-Lösung (20 %)

20 % (w/v) Glucose, sterilfiltriert

MATERIAL

Glycerin-Stammlösung

50 % Glycerin, autoklaviert

Glycerin-Lösung für Elektroporation (10 %)

10 % Glycerin, autoklaviert

HOECHST-Puffer (Harnstoff-Proteinprobenpuffer)

Reduzierend: 8 M Harnstoff, 200 mM Tris-Base, 2 % (w/v) SDS, 200 mM Dithiotreitol (DTT), 0,15 mM Bromphenolblau

Nicht reduzierend: 8 M Harnstoff, 200 mM Tris-Base, 2 % (w/v) SDS, 0,15 mM Bromphenolblau

IPTG-Stammlösung

1 M IPTG, sterilfiltriert, Lagerung -20°C

Kanamycin-Stammlösung

30 mg/ml Kanamycin, sterilfiltriert, Lagerung -20°C

KGB-Puffer (für Restriktionsspaltungen)

1 M Kaliumglutamat, 250 mM Tris-Acetat, pH 7,5, 100 mM Magnesiumacetat, 5 mM β -Mercaptoethanol

Laemmlipuffer (Laempuffer für die SDS-PAGE. 10x)

250 mM Tris-HCl, 2 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

Lysozym-Stammlösung

50 mg/ml in H₂O_{dd}, Lagerung aliquotiert bei -20°C (nach Auftauen nicht noch mal verwenden)

Magnesiumsulfat-Lösung (1 M)

1 M MgSO₄, autoklaviert

Natriumacetat-Lösung (3 M)

3 M Natriumacetat, pH 5,2 eingestellt mit Essigsäure, autoklaviert

Natriumhydroxid-Lösung (1 M)

1 M NaOH, autoklaviert

NBT-Stammlösung

75 mg/ml NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) in 70 % DMF

MATERIAL

oNPG-Lösung

4 mg/ml in Z-Puffer, Lagerung -20°C

pBPA (Bachem)

1 mM in 1 M NaOH

Plasmid Midi-Präparation (Qiagen)

Die Puffer werden vom Hersteller mitgeliefert und werden, wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur gelagert.

P1 (Resuspendierungspuffer):	50 mM Tris Cl. pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A (Lagerung 2 – 8°C)
P2 (Lysepuffer):	200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v)
P3 (Neutralisationspuffer):	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
QBT (Äquilibriumspuffer):	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % Isopropanol (v/v), 0,15 % Triton® X-100 (v/v)
QC (Waschpuffer):	1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % Isopropanol (v/v)
QF (Elutionspuffer):	1,25 M NaCl, 50 mM Tris Cl, pH 8,5, 15 % Isopropanol (v/v)

Reaction Buffer (10 x, Invitex)

670 mM Tris-HCl, pH 8,8, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 4,5 % Triton® X-100, 2 mg/ml Gelatin

Sammelgelpuffer für SDS-Polyacrylamidgele

1,25 M Tris-HCl, pH 6,8

Spectinomycin-Stammlösung

50 mg/ml Spectinomycin, sterilfiltriert, Lagerung -20°C

Sucrosefarbmarker

60 % (w/v) Sucrose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 1 x TAE

T4-DNA-Ligase-Puffer

400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7.8 at 25°C)

Taq-Polymerase-Puffer/ Taq-Puffer (10x)

500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM Magnesiumchlorid, 1 % (w/v) Triton® X-100

TAE-Puffer (50x)

242 g Tris-HCl, 57 ml 100 % Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, ad 1 l

MATERIAL

TBS-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,5 M NaCl

TBST-Puffer (10 x)

100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,5 M NaCl, 2 % (v/v) Tween 20 (Polyethylensorbitanmonolaureate)

TBST/T-Puffer (10 x)

100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,5 M NaCl, 2 % (v/v) Tween 20, 2 % (v/v) Triton® X-100

Tetrazyklin-Stammlösung

10 mg/ml Tetrazyklin in 96 % Ethanol, Lagerung -20°C und dunkel

TFB1

30 mM Kaliumacetat, 100 mM Rubidiumchlorid, 10 mM Calciumchlorid, 50 mM Manganchlorid, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt, sterilfiltriert, Lagerung 4°C

TFB2

10 mM MOPS, 75 mM Calciumchlorid, 10 mM Rubidiumchlorid, 15 % (v/v) Glycerin, pH 6,5 mit KOH eingestellt, sterilfiltriert, Lagerung 4°C

Thrombinspaltpuffer

140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄

Transferpuffer für *Western Blot*

25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, Lagerung 4°C

Trenngelbuffer für SDS-Polyacrylamidgele

1,875 M Tris-HCl, pH 8,8

Tris-Puffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan wurde in H₂O_{dd} aufgelöst und der pH-Wert mit Säure eingestellt. Es wurden für Tris-HCl Salzsäure und für Tris-Acetat Essigsäure verwendet.

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Membrane Binding Solution: 4,5 M Guanidinium-Isothiocyanat, 0,5 M Kaliumacetat, pH 5,0

Membrane Wash Solution: 10 mM Kaliumacetat, pH 5,0, 80 % Ethanol, 16,7 µM EDTA, pH 8,0

Z-Puffer (ohne β-Mercaptoethanol)

60 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 40 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 10 mM MgSO₄ x 7 H₂O

2.13 Verwendete Software

Tab. 14: Liste der verwendeten Software

Programm	Hersteller/Referenz
Acrobat 9 Pro	Adobe
AIDA Image Analyzer für Windows	Raytest
BASReader	Raytest
BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9.0)	[Hall, 1999]
Endnote X2.0.4	Thompson Reuters
Image J	National Institute of Health (NIH), USA
Insight II	AccelRys Software Inc.
Lasergene 8	DNASTAR, Inc.
Office 2003	Microsoft
Photoshop CS2	Adobe
PyMOL (version 0.98)	DeLano Scientific LLC
RFPC Software	Shimadzu Corporation
SigmaPlot 11.0	Systat Software Inc.
Unicorn 5.01	Amersham Biosciences

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

3.1.1 Stammhaltung und Lagerung von *Escherichia coli*-Zellen

Die verwendeten Bakterienstämme von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden zur längerfristigen Aufbewahrung als Glycerin-Stammkulturen gelagert. Dazu wurde eine Übernachtskultur des betreffenden Stammes mit einer autoklavierten 50 %igen Glycerin-Lösung im Verhältnis 1:3 (v/v) vermischt und bei -80°C aufbewahrt. Zur kurzfristigen Aufbewahrung wurden die Bakterienstämme auf Selektionsplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37°C angezogen und konnten danach für einige Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

3.1.2 Vermehrung von *Escherichia coli*

Die Vermehrung der verwendeten *E. coli*-Stämme erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C in LB-Medium. Besaßen die Stämme eine Antibiotikaresistenz wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Kulturen bis 5 ml Volumen wurden in Kulturröhrchen mit einem Winkel von ca. 45° bei 150 Upm vermehrt. Größere Kulturen mit 50 ml Volumen wurden in Erlenmeyerkolben bei 150 Upm schwenkend angezogen.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl durch Messung der optischen Dichte

Die optische Zelldichte einer Bakterienkultur wurde in einem Photometer (Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das unbeimpfte Medium bestimmt. Um eine hinreichende Genauigkeit zu gewährleisten, wurden die Kulturen zuvor auf einen Wert der OD₆₀₀ kleiner 1 verdünnt. Die Zelldichte wurde dann aus dem gemessenen Wert abgeschätzt. Eine OD₆₀₀ von 0,1 entsprach dabei ungefähr 10⁸ Zellen/ml.

3.1.4 Präparation und Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen mittels Hitzeschock

Das Prinzip der Methode gehört schon lange zu den Standardmethoden [Hanahan, 1983]. Es wurden 50 ml LB-Medium in einem 100 ml Kolben mit 1 ml über Nacht-Kultur (üN-Kultur) des entsprechenden Stammes bei 37°C und 150 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde für 5 min auf Eis gekühlt und in einem 50 ml Falcon Röhrchen durch Zentrifugation (Heraeus Multifuge, 4.000 Upm, 10 min, 4°C) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden vorsichtig in 10 ml TFB1-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension erneut zentrifugiert (Heraeus Multifuge, 2.000 Upm, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde in 2 ml TFB2-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden Aliquots zu 200 µl in gekühlte Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert. Die auf diese Weise kompetent gemachten *E. coli*-Zellen konnten direkt zur Transformation eingesetzt oder bei -80°C gelagert werden.

METHODEN

Zur Transformation wurden die Zellen bei RT aufgetaut und anschließend 10 min auf Eis gekühlt. Die zu transformierende DNA wurde in einem Volumen von maximal 10 µl zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurde der Transformationsansatz für 90 sek einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt und 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurden die Proben 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden Aliquots auf Selektionsagarplatten ausplattiert.

3.1.5 Transformation von *Escherichia coli* durch Elektroporation

Es wurden 50 ml LB-Medium in einem 100 ml Kolben mit 0,5 ml üN-Kultur des entsprechenden Stammes bei 37°C und 150 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde geerntet (4500 Upm, 10 min, 4°C) und im Anschluss dreimal mit je 20 ml 10 %igem eiskaltem Glycerin gewaschen. Nach Abgießen des Glycerins des letzten Waschschrittes, wurde das Zellpellet in dem zurücklaufenden Glycerin vorsichtig resuspendiert.

Für die Transformation wurden 80 µl Aliquots der kompetenten Zellen mit 2 µl DNA versetzt, in eine Elektroporationsküvette gegeben und elektroporiert (Elektroporator, BioRad, Einstellungen: *Voltage*: 1700 V, *Capacitance*: 25 µF, *Resistance*: 100 Ω, *Cuvette*: 1 mm). Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz für 1 h bei 30°C bzw. 37°C inkubiert (Heizblock, ~ 700 Upm). Anschließend wurden Aliquots auf Selektionsplatten ausplattiert.

3.1.6 Tropftest zur Analyse der Lebensfähigkeit/ Komplementationstest

Mit dem Tropftest oder auch Komplementationstest ist es möglich, die Lebens- und Wachstumsfähigkeit eines Stammes unter verschiedenen Bedingungen zu prüfen. In dieser Arbeit wurde der Tropftest zur Untersuchung der Lebensfähigkeit eines konditional letalen Stammes und der Komplementierbarkeit seiner Letalität durch Plasmid-kodierte Proteine eingesetzt. In dem verwendeten Stamm SB44452 wurde das *skp*-Gen deletiert ($\Delta skp_{zae-3095::Tn10Km}$) und das chromosomale *surA*-Gen steht unter Kontrolle eines IPTG-regulierbaren Promotors ($P_{LacO-1-surA}$). Da eine gleichzeitige Deletion des *surA*- und des *skp*-Gens zu einem synthetisch letalen Phänotypen führt [Behrens *et al.*, 2001; Rizzitello *et al.*, 2001], ist der Stamm nur in Anwesenheit von IPTG oder eines komplementierenden Plasmides lebensfähig (siehe Abb. 19a). Die zu testenden Stämme wurden für jeden Versuch frisch mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Die transformierten Stämme wurden über Nacht mit den entsprechenden Antibiotika und 1 mM IPTG in LB-Medium bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wurden die Übernachtskulturen auf eine OD₆₀₀ von 4,0 eingestellt und anschließend Verdünnungsreihen von 10⁻¹ bis 10⁻⁷ hergestellt. Hierfür wurden jeweils 900 µl LB mit 100 µl der vorhergehenden Verdünnungsstufe durch Vortexen vermischt. Von den Verdünnungsstufen 10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁵ und 10⁻⁷ wurden je 10 µl jeder Kultur auf Antibiotika-haltige LB-Platten mit und ohne IPTG aufgetropft. Nachdem die Zellsuspension vollständig in den Agar eingezogen war, wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte wurden durch Erhitzen für 20 min auf 181°C sterilisiert. Hitzestabile Lösungen wurden für 20 min bei 121°C autoklaviert. In der Hitze nicht beständige Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt und getrocknet. Hitzelabile Bestandteile von Lösungen wurden als konzentrierte Stammlösungen hergestellt und vor der Zugabe zu bereits sterilen Lösungen durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

3.2.2 Isolierung von DNA aus wässrigen Lösungen

3.2.2.1 Fällung mit Ethanol

Die Ethanolfällung dient der Konzentration von DNA und der Entfernung von Proteinen, Salzen und freien Nukleotiden. Proteine und Salze werden zwar nicht vollständig, für viele Zwecke jedoch in ausreichendem Maße entfernt. Um eine effiziente Fällung der DNA zu gewährleisten, wird die Konzentration monovalenter Kationen durch die Zugabe von Salz erhöht. Auf diese Weise wird die Dielektrizitätskonstante erhöht, welche die Abstoßung des negativ geladenen Phosphodiester-Rückgrats vermindert. Der anschließende Lösungsmittelentzug durch die Zugabe von Ethanol ermöglicht die DNA-Fällung.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat und 3 Vol 96 % Ethanol *p.A.* mindestens 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gefällt und anschließend abzentrifugiert (Tischzentrifuge Heraeus Biofuge, 13000 Upm, 4°C, 30 min). Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Gefäße wurden, nach vollständiger Entfernung des Ethanols, offen auf einem 37°C Heizblock inkubiert, bis alle Ethanolreste entfernt und die Pellets trocken waren. Anschließend wurde das DNA-Pellet je nach gewünschter Konzentration in einem entsprechenden Endvolumen H₂O_{dd} aufgenommen.

3.2.2.2 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (Phenol-Chloroform)

Die Extraktion mit Phenol und Chloroform diente der Entfernung von Proteinen, Ethidiumbromid, Phenolresten oder anderen Resten hydrophober Natur.

Die zu extrahierende DNA-Lösung wurde auf 200 µl gebracht und mit 1 Vol Phenol versetzt, gevortext und zur schnelleren Trennung zentrifugiert (Tisch-Zentrifuge, 3 min). Es bildeten sich drei Phasen: eine untere organische Phase, eine obere DNA-haltige wässrige Phase und dazwischen eine Interphase, in welcher die denaturierten Proteine ausgefallen waren. Die organische Phase und die Interphase wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß transferiert und der Extraktionsschritt erst mit 1 Vol Phenol/Chloroform, dann mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Schließlich konnte die DNA aus dem gereinigten Überstand gefällt werden.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von doppelsträngiger DNA erfolgte in Agarosegelen unterschiedlicher Größe. Die Gele besaßen eine Agarosekonzentration von 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer bis zur vollständigen Lösung in einem Mikrowellenofen aufgeköcht und als fertige Agaroselösung bei 55°C aufbewahrt. Das Gel konnte direkt in den abgegrenzten Bereich einer Flachbett-Gelkammer (100 x 7 x 0,5 mm) gegossen und der entsprechende Kamm gesetzt werden. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Taschenkamm entfernt und die Gelkammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt bis das Gel komplett bedeckt war. Die Proben wurden mit ca. 1/5 V Sucrosefarbmarker versetzt und die Geltaschen damit beladen. Zur Längen- und Konzentrationsbestimmung der DNA-Banden wurden DNA-Fragmentlängenstandards mitgeführt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 80 V für 45 – 60 min durchgeführt. Anschließend wurden die Gele für ca. 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad (100 µg/ml in H₂O_{dd}) schwenkend gefärbt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im UV-Licht (302 nm) durch die Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.2.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System der Firma Promega verwendet. Die Methode beruht auf der Auflösung der Agarose und der nachfolgenden Bindung der DNA an eine Silica-Matrix (*Membrane Binding Solution*), sowie der Entfernung störender Faktoren durch Waschpuffer (*Wash Solution*) und der Elution der DNA (H₂O_{dd}).

Das aus dem Gel aufzureinigende DNA-Fragment wurde auf dem UV-Durchlichttisch mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Pro 10 mg Gelmasse wurden 10 µl *Membrane Binding Solution* zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz bei 50 – 65°C bis zur vollständigen Auflösung der Agarose inkubiert. Eine *SV Minicolumn* wurde in ein *Collection Tube* gesteckt und das aufgelöste Gelmaterial auf die Säule gegeben. Nach einer ein-minütigen Inkubation wurde die Säule für eine Minute bei 13.000 U_{pm} zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Danach folgten zwei Waschschritte mit 700 µl *Wash Solution* und 1 min Zentrifugation bzw. 500 µl *Wash Solution* und 5 min Zentrifugation. Im Anschluss erfolgte noch ein ein-minütiger Zentrifugationsschritt, der zur vollständigen Entfernung von Ethanolresten diente. Die Elution erfolgte durch ein-minütige Inkubation von 50 µl Nuklease-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation (1 min, 13.000 U_{pm}). Die gereinigten DNA-Fragmente wurden gleich verwendet oder für spätere Anwendungen bei -20°C gelagert.

3.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen

Die Nukleinsäure-Konzentration einer wässrigen Lösung ist aus einer Messung der Absorption einer entsprechenden Verdünnung bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz bestimmbar. Die Messung erfolgte photometrisch gegen Wasser an einem NanoDrop (peqlab Biotechnologie GmbH) mit einer virtuellen Schichtdicke von 1 cm. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg

dsDNA/ml. Durch zusätzliche Messung einer Wellenlänge von 280 nm konnte über den Quotienten der beiden Werte eine Aussage über die Reinheit der DNA getroffen werden. In proteinfreien Proben sollte der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ bei 2 liegen.

3.2.6 Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

3.2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Invisorb® Spin Plasmid Mini Two)

Die Plasmid-Präparation in analytischen Mengen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse ist eine relativ einfache und schnelle Methode um Plasmide aus Kulturen von 2–4 ml zu isolieren. Die genaue Zusammensetzung der Puffer wird vom Hersteller nicht angegeben. Für die Präparation wurden die plasmidtragenden Zellen in 5 ml Selektivmedium über Nacht bei 37°C inkubiert. Von der Kultur wurden bis zu 4 ml in einem Eppendorf Reaktionsgefäß pelletiert (Heraeus Biofuge, 14.500 Upm, 1 min). Das Zellpellet wurde vollständig in 250 µl Solution A (*Invisorb*®, enthält RNase) resuspendiert und nach Zugabe von 250 µl Solution B (*Invisorb*®) 5 mal geschwenkt. Die Lyse der Zellen erfolgte für 5 min bei RT. Zur Neutralisation wurden 250 µl Solution C (*Invisorb*®) zugegeben und der Ansatz mehrmals geschwenkt. Durch diesen Schritt wurde eine effiziente Fällung von chromosomaler DNA, Membranfragmenten, SDS und Proteinen erreicht. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zentrifugiert (Heraeus Biofuge, 13.000 Upm, 5 min) und der Überstand vorsichtig auf einen Spin Filter gegeben. Nach einer einminütigen Inkubation wurde der Ansatz zentrifugiert (Heraeus Biofuge, 9.500 Upm, 1 min). Der Durchlauf wurde verworfen und der Spin Filter mit der gebundenen DNA mit 750 µl Wash Solution (*Invisorb*®) gewaschen und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung des Ethanols wurde der Spin Filter im Anschluss noch mal bei 13.000 Upm für 3 min zentrifugiert. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte mit 50 µl H₂O_{dd}, welches für 5 min inkubiert wurde. Nach Zentrifugation (Heraeus Biofuge, 9.500 Upm, 1 min) befand sich die gereinigte Plasmid-DNA im Durchlauf.

3.2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Qiagen Plasmid Midi)

Zur Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab kam das *Qiagen Plasmid Midi*-Kit zum Einsatz, welches ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse basiert. Es wurden 50 ml Übernachtskultur geerntet (Heraeus Multifuge, 4.500 Upm, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 4 ml P1-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 4 ml P2-Puffer, vorsichtiges Schwenken und eine 5-minütige Inkubation bei RT. Eine vollständige Durchmischung der Komponenten wurde durch eine gleichmäßige Blaufärbung durch einen in Puffer P2 enthaltenen Farbstoff (*LyseBlue reagent*) angezeigt. Die anschließende Zugabe von 4 ml gekühltem P3-Puffer und vorsichtiges Schwenken führte zum Verschwinden der Blaufärbung und bewirkte gleichzeitig eine schlagartige Neutralisation der Suspension und somit die Fällung von chromosomaler DNA, SDS, Membranfragmenten und Proteinen. Zur Aufklärung des Lysats wurde der Ansatz für 30 min zentrifugiert (4.000 Upm, 4°C) und der Plasmidhaltige klare Überstand im Anschluss auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-Säule gegeben. Der Durchfluss durch die Säulenmatrix erfolgte ausschließlich anhand der Gravitation, wobei die Bindung der DNA an die Säulenmatrix nach dem Prinzip des Anionenaustauschs vonstatten ging. Die an der

METHODEN

Säulenmatrix haftende Plasmid-DNA wurde zweimal mit je 10 ml QC-Puffer gewaschen und dann mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte mit 0,7 Vol Isopropanol. Hierzu wurden je 833 µl Eluat gleichmäßig in 6 Eppendorfgefäße verteilt und mit jeweils 583 µl Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation (Heraeus Biofuge, 30 min, 14.000 Upm, 4°C) wurden die DNA-Pellets mit je 500 µl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert (Heraeus Biofuge, 10 min, 13.000 Upm, RT) und im Anschluss bei 37°C getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in je 10 µl H₂O_{dd} gelöst und in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Dies wurde nochmals 5 min zentrifugiert (13.000 Upm, RT) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Der DNA-Gehalt der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt.

3.2.7 Homologe Rekombination nach [Datsenko and Wanner, 2000]

In *E. coli* kann eine Mutation bzw. Deletion nicht direkt durch Transformation mit linearer DNA eingeführt werden, da diese durch intrazelluläre Exonukleasen degradiert werden würde [Lorenz and Wackernagel, 1994]. Fehlt die Exonuklease V des RecBCD-Rekombinationskomplexes so ist die Transformation mit linearer DNA erfolgreich [Cosloy and Oishi, 1973]. Daher wird hier die Methodik der homologen Rekombination nach [Datsenko and Wanner, 2000] verwendet, um im *shyD*-negativen Hintergrund des Stammes SB44097 das *surA*-Gen zu deletieren und durch eine Kanamycin-Kassette zu ersetzen. Hierbei wird das sogenannte Red-System verwendet, welches die intrazelluläre Exonuklease V inhibiert und die Rekombination fördert. Die Gene des Red-Systems sind auf dem Temperatur-sensitiven Plasmid pKD46 enthalten [Datsenko and Wanner, 2000].

Zunächst wurde das für die homologe Rekombination benötigte Plasmid pKD46 durch Elektroporation in den Stamm SB44097 eingebracht. Zur Erhaltung des temperatursensitiven Plasmides pKD46 wurde der Stamm nach der Transformation bei 30°C angezogen. Das weiterhin benötigte *sur::km* enthaltende PCR-Fragment lag schon in der Arbeitsgruppe vor. Dieses wurde anschließend mittels Elektroporation in den bereits das Plasmid pKD46 enthaltenden Stamm SB44097 eingebracht. Das im Anschluss an die erfolgte homologe Rekombination nicht mehr benötigte Plasmid pKD46 wurde durch Anzucht des Stammes bei 37°C entfernt.

3.2.8 *In vitro* Transkription/Translation mit dem PURExpress™ *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB)

Für die *in vitro* Herstellung von längeren LamB-abgeleiteten Peptiden bzw. Vollängen-LamB wurde das zellfreie System PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit der Firma NEB (Cat. No. E6800S) verwendet. Dieses Kit bietet den Vorteil gegenüber zellbasierten Kits, dass in seiner definierten Zusammensetzung kein SurA vorhanden ist, da es aus rekonstituierten Komponenten des *E. coli* Translationsapparates besteht [Shimizu *et al.*, 2005]. So sind spätere Reaktionen mit bereits im Extrakt vorhandenem SurA ausgeschlossen. Laut Auskunft der Herstellerfirma NEB sind alle Proteinfaktoren rekombinant hergestellt und frei von Exonukleasen, RNasen und Proteasen aus *E. coli* präpariert (www.neb-online.de/neb-aktionen/14-purexpress-in-vitro-protein-synthesis-kit). Um RNase-

METHODEN

Verunreinigungen aus der Plasmidpräparation zu entfernen, wird angeraten einen RNase Inhibitor zu jeder Reaktion hinzuzufügen.

Mit diesem Kit ist es außerdem möglich *in vitro* neu-synthetisierte Proteine durch Affinitätschromatographie von den Bestandteilen des Kits zu isolieren, da diese Proteinfaktoren alle über einen His-tag verfügen [Shimizu *et al.*, 2005]. Dieses System der zellfreien *in vitro* Transkription/Translation wurde u.a. bereits erfolgreich für *Crosslinking*-Reaktionen mit pBPA-markiertem Trigger Faktor benutzt [Lakshmipathy *et al.*, 2007].

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde für die ersten Versuche zunächst mit halben Ansätzen im Vergleich zu den Herstellerangaben gearbeitet. Ein standardmäßig laut Herstellerprotokoll vorgegebener Reaktionsansatz ist in der folgenden Tabelle zu finden.

Tab. 15: Reaktionsansatz für die Einzelreaktion für die *in vitro* Transkription/Translation mit dem PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB)

Solution A	10 µl
Solution B	7,5 µl
Murine RNase Inhibitor (NEB M0314S)	20 units
(ggf. ³⁵ S-Methionin)	(1 µl)
Plasmid-DNA	250 ng
H ₂ O _{dd}	ad 25 µl

Solution A und Solution B des PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kits (NEB) werden standardmäßig bei -80°C gelagert. Vor der Benutzung werden diese auf Eis aufgetaut und die Ansätze entsprechend den Vorgaben in Tab. 15 zusammengegeben und anschließend bei 37°C für 2 h inkubiert. Die Produkte wurden dann über eine Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und anschließend entweder im *Western Blot* oder mittels Autoradiographie analysiert.

3.3 Enzymatische Manipulation von DNA

3.3.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die zu spaltende DNA sollte so vorliegen, dass keine Kontaminationen die Spaltung verhindern könnten. Daher sollten keine organischen Lösungsmittel wie Phenol, Chloroform oder Ethanol enthalten sein, diese zu einer Denaturierung des zugesetzten Enzyms führen. EDTA könnte die für die Spaltung notwendigen Magnesium-Ionen wegtitrieren und Salze könnten salzempfindliche Enzyme inhibieren.

Die Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde unter den empfohlenen Temperaturbedingungen für mindestens eine Stunde inkubiert.

Wenn möglich wurde das Enzym nach der Reaktion anhand der Herstellerangaben durch Hitze inaktiviert. Der Erfolg der Spaltung wurde im Anschluss mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese untersucht.

Tab. 16: Standardreaktionsansätze für die analytische bzw. präparative Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

	Analytische Spaltung	Präparative Spaltung
Plasmid-DNA	100 ng/μl	100 ng/μl
Restriktionsenzym	1 – 2 U	1 – 2 U
KGB-Puffer (10x)	1 μl	5 μl
H ₂ O _{dd}	ad 10 μl	ad 50 μl

3.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Ligationsprodukt wurde mit einem bis zu fünffachen molaren Überschuss an DNA-Insert-Fragment gegenüber dem DNA-Vektor-Fragment (100 ng – 1 μg) durchgeführt. In der Regel wurden T4-DNA-Ligase-Puffer (1x) und 1 – 2 U T4-DNA-Ligase in einem Ligationsansatz von 10 μl verwendet. Die Ligation wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert, da dies zu einer verbesserten Hybridisierung von überhängenden DNA-Enden (*sticky ends*) führte.

3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) [Mullis and Faloona, 1987] steht eine potente *in vitro*-Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zur Verfügung. Die PCR ermöglicht eine selektive Vervielfältigung einer DNA-Matrize aus einem komplexen DNA-Gemisch. Im ersten Schritt wird durch Erhitzen die doppelsträngige DNA-Vorlage in einzelsträngige DNA überführt (Denaturierung). Beim Absenken der Temperatur lagern sich zwei Oligonukleotid-Primer sequenzspezifisch an die Matrizen-DNA an (Annealing) und flankieren somit die zu amplifizierenden komplementären Zielregionen. Bei der Primer-Extension (Elongation) werden die Primer mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase von 5' nach 3' komplementär zur ursprünglichen Duplex-DNA bei hoher Temperatur verlängert. Durch diese hohe Temperatur wird eine unspezifische Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrize verhindert. Es wird eine bestimmte Anzahl von Amplifikationszyklen durchgeführt, wodurch sich die durch die beiden Primer flankierte DNA-Region akkumuliert.

Die PCR-Bedingungen müssen der Länge der zu amplifizierenden Sequenz sowie der Länge und des G/C-Gehaltes des verwendeten spezifischen Primer angepasst werden.

Die spezifische Schmelztemperatur T_M eines Oligonukleotids wird nach folgender empirischer Formel berechnet, die sowohl den relativen G/C-Gehalt (% G/C) als auch die Länge der Oligonukleotide (n) berücksichtigt:

$$T_M [^{\circ}C] = 69,3 + 0,41 \cdot (\%G/C) - \frac{650}{n}$$

Die optimale Annealingtemperatur T_A errechnet sich aus den Schmelztemperaturen T_{M1} und T_{M2} der beiden verwendeten Primer:

$$T_A [^{\circ}C] = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3^{\circ}C$$

METHODEN

Die PCR-Reaktionen wurden einem Cycler der Firma Biometra durchgeführt. Nach Beenden der PCR wurden die PCR-Produkte (ausgenommen der Sequenzierungs-PCR, 3.3.3.4) auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert. Für sehr kleine PCR-Fragmente wurden bis zu 5 %ige Agarosegele verwendet.

3.3.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Eine Taq-DNA-Polymerase benötigt je nach Hersteller und Produkt ungefähr 1 min zur Elongation von 1 kb DNA. Standardmäßig wurden 100 ng DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Puffer und der Q-Solution werden vom Hersteller Fermentas nicht genau angegeben.

Tab. 17: Standardreaktionsansatz für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

DNA (in H ₂ O _{dd})	x µl
TopTaq PCR-Puffer (10 x)	5 µl
Q-Solution (5 x)	10 µl
Primer up [100 pmol/µl][Behrens <i>et al.</i> , 2001]	0,5 µl
Primer lo [100 pmol/µl]	0,5 µl
dNTPs [100 mM]	0,5 µl
TopTaq DNA-Polymerase	0,25 µl
H ₂ O _{dd}	ad 50 µl

Tab. 18: Standardprogramm für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

1. (Initiale Denaturierung)	95°C	5 min
2. (Denaturierung)	95°C	30 sek
3. (Annealing)	T _A [°C]	40 sek
4. (Elongation)	72°C	1 min/1 kb
5. (abschließende Elongation)	72°C	5 min
6. (Kühlung)	10°C	hold

Die Schritte 2 bis 4 des Standardprogramms wurden in 30 Zyklen wiederholt, was zur sequenzspezifischen, exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments führte.

3.3.3.2 Polymerasekettenreaktion auf ganze Zellen (Kolonie-PCR)

Die Kolonie-PCR [Hofmann and Brian, 1991] kann auf ganze Zellen einer Bakterienkolonie angewendet werden, um DNA-Sequenzen (*inserts*) aus dem Genom oder von in den Zellen lokalisierten Plasmiden zu amplifizieren. Dies ist besonders bei schnellen Klonierungsanalysen vorteilhaft, da auf diese Weise zeitaufwendige Plasmidisolationen umgangen werden können.

Für die Durchführung wurde 30 µl H₂O_{dd} in einem PCR Reaktionsgefäß vorgelegt und etwas Bakterienmaterial einer Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher von einer Nährbodenplatte in dieses überführt. Nach der initialen Denaturierung wurde diesem 20 µl eines vorbereiteten Mastermixes zugegeben, welcher alle benötigten Komponenten für die Amplifikation enthielt. Der initiale Denaturierungsschritt bei 98°C diente dazu die Bakterien aufzuschließen und die DNA für die PCR zugänglich zu machen.

METHODEN

Tab. 19: Reaktionsansatz für den Mastermix (1x) für die Kolonie-PCR

H ₂ O _{dd}	9,5 µl
10 x Puffer	5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
dNTPs [100 mM]	1 µl
Primer up [100 pmol/µl]	0,5 µl
Primer lo [100 pmol/µl]	0,5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl

Tab. 20: Programm für die Kolonie-PCR

1. (Initiale Denaturierung)	98°C	5 min
2. (Zugabe Mastermix)	85°C	1 – 3 min
3. (Denaturierung)	95°C	30 sek
4. (Annealing)	T _A [°C]	30 sek
5. (Elongation)	72°C	1kb/min
6. (abschließende Elongation)	72°C	5 min
7. (Kühlung)	10°C	hold

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 30 Zyklen wiederholt, was zur exponentiellen Amplifikation der DNA führte. Durch Agarosegelelektrophorese (3.2.3) der PCR Produkte wurden dann Klone mit *inserts* der richtigen Länge identifiziert.

3.3.3.3 Quick change mutagenesis-PCR (QC-PCR)

Die zielgerichtete Substitution von Basenpaaren erfolgte durch die Methode der "quick change mutagenesis PCR" (QC-PCR) [Nelson and McClelland, 1992; Wang and Malcolm, 1999]. Für diese Form der PCR kamen spezielle Oligonukleotide zum Einsatz, die den Austausch einzelner Nukleotide ermöglichen. Diese mindentens 24 – 28 Basen langen Oligonukleotide wurden so definiert, dass an der entsprechenden Position in der DNA-Sequenz ein ausgewähltes Nukleotid gegen ein beliebiges anderes ersetzt wird. Damit das Oligonukleotid trotz einer möglichen Fehlpaarung mit dem auszutauschenden Nukleotid anhybridisiert, sollten die flankierenden Bereiche mindestens 10 Basen umfassen.

Tab. 21: Reaktionsansatz für die QC-PCR. Standardmäßig wurden 100 ng DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt.

DNA (in H ₂ O _{dd})	x µl
Primer up [100 pmol/µl]	0,5 µl
Primer lo [100 pmol/µl]	0,5 µl
dNTPs [100 mM]	0,5 µl
Cloned Pfu DNA Pol. Reaktionspuffer (10 x)	2,5 µl
Pfu Turbo Polymerase	0,25 µl
H ₂ O _{dd}	ad 25 µl

Tab. 22: Programm für die QC-PCR

1. (Initiale Denaturierung)	95°C	5 min
2. (Denaturierung)	95°C	30 sek
3. (Annealing)	T _A [°C]	1 min
4. (Elongation)	68°C	14 min
5. (abschließende Elongation)	68°C	5 min
6. (Kühlung)	4°C	hold

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 30 Zyklen wiederholt, welches zu einer exponentiellen Amplifikation des Plasmides führte. Dabei ist zu beachten, dass die neu-synthetisierten Plasmide doppelsträngig sind, aber jeder Strang bedingt durch die Amplifikation über einen Bruch verfügt.

3.3.3.4 PCR für Sequenzierung

Zur Sequenzierung von ca. 200 ng Plasmid-DNA wurde eine PCR mit dem "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" durchgeführt.

Tab. 23: Reaktionsansatz für die PCR für die Sequenzierung

Plasmid-DNA (in H ₂ O _{dd})	x µl
Primer [10 pmol/µl]	0,5 µl
BigDye 3.1 Ready Reaction Mix	1 µl
BigDye Terminator Sequencing Puffer (5 x)	1,5 µl
H ₂ O _{dd}	ad 10 µl

Tab. 24: Programm für die PCR für die Sequenzierung.

1. (Initiale Denaturierung)	96°C	2 min
2. (Denaturierung)	96°C	10 sek
3. (Annealing)	45 – 60°C	5 sek
4. (Elongation)	60°C	4 min
5. (Kühlung)	4°C	hold

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 25 Zyklen wiederholt. Die auf diese Weise amplifizierte DNA-Fragmente wurden im Sequenzierungslaboratorium des Robert-Koch-Institutes durch Gelfiltration aufgereinigt und anschließend sequenziert. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte durch das Programm "BioEdit sequence alignment editor and analysis, Version 7.0.9.0".

3.3.4 Verdau von methylierter DNA mit *DpnI*

Direkt in *E. coli* amplifizierte und daraus präparierte liegt in methylierter Form vor. Wohingegen PCR-Produkte unmethyliert sind. Das Enzym *DpnI* bindet spezifisch methylierte DNA und verdaut diese. Daher kann diese genutzt werden, um methylierte DNA von PCR-Produkten zu trennen, da diese nicht von *DpnI* gespalten werden.

Diese Methode wurde eingesetzt, um nach der QC-PCR die eingesetzte Vektor-DNA zu entfernen und somit nur die neu-generierten Vektoren zu behalten, die über die eingeführte Mutation verfügen. Hierfür

wurde im Anschluss an die QC-PCR dem PCR-Ansatz 1 μ l *DpnI* zugefügt und das Ganze für 3-4 Stunden bei 37°C inkubiert. *DpnI* wurde durch Inkubation bei 80°C für 20 min inaktiviert.

3.4 Proteinchemische Arbeitsmethoden

3.4.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine lassen sich unter denaturierenden Bedingungen über SDS-haltige Polyacrylamidgele ihrer Größe nach auftrennen [Laemmli, 1970]. Das in den Gelen enthaltene Detergenz SDS besitzt die Fähigkeit Sekundär- und Tertiärstrukturelemente von Proteinen aufzulösen. Für die Analyse von Proteinprodukten wurden Trenngelle von 12,5 %, 15 % bzw. 17,5 % mit jeweils 5 %igen Sammelgelen verwendet. Für kleinere Proteine bzw. Proteinfragmente bietet es sich an ein Gel mit höherer Polyacrylamid-Konzentration zu verwenden.

Alternativ wurden für die gleichzeitige Detektion von kleinen und großen Proteinen vorgefertigte 10 – 20 %ige Polyacrylamidgele der Firma BioRad (10 – 20 % Ready Gel® Tris-HCl Gel, 12 Well, 20 μ l) verwendet.

3.4.1.1. Herstellung von Polyacrylamidgelen (12,5 %, 15 %, 17,5 %) für den immunochemischen Nachweis von Proteinen (*Western Blot*)

Für die Durchführung der Polyacrylamidgelelektrophorese wurde die Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad) verwendet. Mittels der verschiedenen Gießstände für dieses System konnten bis zu 12 SDS-Minigele gleichzeitig gegossen werden. Hierfür wurden die in Tab. 25 exemplarisch für 4 Minigele aufgeführten Mengen entsprechend angepasst.

Tab. 25: Rezept zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen. Die angegebenen Mengen sind ausreichend für 4 SDS-Minigele für die Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad)

	Trenngel			Sammelgel
	12,5 %	15 %	17,5 %	5 %
Rotiphorese Gel 30 (Roth)	6,3 ml	7,5 ml	8,8 ml	2,4 ml
H ₂ O _{dd}	6,3 ml	5 ml	3,7 ml	10,8 ml
1,875 M Tris-Puffer, pH 8,8	3 ml	3 ml	3 ml	-
1,25 M Tris-Puffer, pH 6,8	-	-	-	1,5 ml
20 % SDS	75 μ l	75 μ l	75 μ l	75 μ l
25 % APS	20 μ l	20 μ l	20 μ l	30 μ l
TEMED*	10 μ l	10 μ l	10 μ l	15 μ l

* TEMED wurde erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben, da diese Substanz zum Polymerisieren des Acrylamids führt.

Die gewünschte Anzahl Glasplatten wurde in den Gießstand eingespannt und zunächst wurde das Trenngel vorsichtig und blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Hierbei wurde die Gießkammer ca. zu 2/3 mit der Gelflüssigkeit gefüllt. Für die Polymerisationsphase und für den Erhalt einer gleichmäßigen Oberfläche wurden die Gele mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des

METHODEN

Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel blasenfrei auf das Trenngel gegossen und die Taschenkämme der gewünschten Größe zwischen die Glasplatten in das Sammelgel gesteckt. Nach vollständiger Polymerisierung des Sammelgels wurden die Polyacrylamidgele direkt für die Elektrophorese eingesetzt oder in mit demineralisiertem Wasser befeuchtete Papiertücher und eine Plastiktüte eingeschlagen. Auf diese Weise konnten die SDS-Gele bis zu mehrere Wochen ohne Qualitätsverlust bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.4.1.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Polyacrylamidgele wurden in der Laufkammer der Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) befestigt und diese bis zur Markierung mit 1 x Lämmli-Laufpuffer gefüllt. Nach Entfernen des Taschenkamms konnten die vorbereiteten Proben in die Geltaschen gefüllt werden. Als Protein-Molekulargewichtsmarker dienten 5 µl des entsprechenden Prestained Protein Ruler (Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer konstanten Stromstärke von 80 mA zum Einlaufen der Proben in das Gel. Nach ca. einer halben Stunde wurde die Stromstärke auf 120 mA erhöht und das Gel bis zum Durchlauf der Farbmarkerbande laufen gelassen.

3.4.1.3 Färbung der Polyacrylamidgele

Zur direkten, unspezifischen Detektion von Proteinen wurden die Gele nach Entfernen aus der Elektrophorese-Apparatur für mindestens 20 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte durch mehrmaliges Aufkochen der in Wasser eingelegten Gele.

3.4.2 Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (*Western Blot*)

Zum immunochemischen Nachweis der mit SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden diese mittels Elektronentransfer auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierzu wurden drei auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnittene Filterpapiere (Whatman) mit *Western Blot*-Transferpuffer getränkt und auf die Graphitanode einer Blotting-Apparatur (peqlab Biotechnologie GmbH) gelegt. Auf das Filterpapier wurde eine auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnittene Nitrozellulose-Membran gelegt, die ebenfalls mit *Western Blot*-Transferpuffer getränkt worden war. Das die Proteine enthaltende Polyacrylamidgel wurde in *Western Blot*-Transferpuffer geschwenkt und in nassem Zustand auf die Nitrozellulose-Membran gelegt. Drei weitere auf Gelgröße zugeschnittene Filterpapiere wurden ebenfalls mit Transferpuffer getränkt und darauf gelegt. Die verschiedenen Lagen sollten möglichst blasenfrei aufeinander gelegt werden, um einen vollständigen Transfer zu gewährleisten. Es folgten das Aufsetzen der Kathode und der Elektronentransfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran. Die Proteine wurden für eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 10 V aus dem Gel auf die Nitrozellulose transferiert.

METHODEN

3.4.2.1 Proteinnachweis über die Bindung von Antikörper-gekoppelter Alkalischer Phosphatase

Nach dem Transfer wurde die Blotting-Apparatur auseinander gebaut und die Membran für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in TBST-Puffer mit 3 % (w/v) fettarmen Milchpulver geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach folgte eine mindestens einstündige Inkubation mit dem ersten Antikörper in 1 x TBST-Puffer mit 1 % (w/v) fettarmem Milchpulver. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min mit 1 x TBST-Puffer wurde der zweite Antikörper in 1 x TBST-Puffer zugegeben und die Membran unter Schwenken für mindestens eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1 x TBST-Puffer (für je 10 min) wurde der *Western Blot* entwickelt. Dazu wurde eine frisch hergestellte Lösung aus 12,5 µl NBT-Stammlösung und 75 µl BCIP-Stammlösung in 25 ml AP-Puffer auf die Membran gegeben und diese darin geschwenkt bis Banden zu sehen waren. Die Farbreaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit demineralisiertem Wasser gestoppt.

Tab. 26: Übersicht über die eingesetzte Verdünnung der im *Western Blot* verwendeten Antikörper (Alkalische Phosphatase gekoppelt)

Antikörper	Verdünnung	Quelle
<u>Primärantikörper</u>		
anti-SurA	1:10.000	Eigene AG
anti-MBP	1:10.000	NEB-Biolabs
<u>Sekundärsantikörper</u>		
anti-rabbit-AP	1:10.000	Sigma
anti-mouse-AP	1:10.000	Sigma

3.4.2.2 Proteinnachweis über die Bindung von Antikörper-gekoppelter Merretich-Peroxidase

Im Anschluss an den Transfer wurde die Apparatur auseinander gebaut und die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungen über Nacht bei Raumtemperatur in 1 x TBS-Puffer mit 1 % (w/v) Casein geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen für je 10 min in 1 x TBST/T und einmaligem Waschen für 10 min in TBS wurde die Membran für mindestens 1 Stunde mit dem ersten Antikörper in 1 x TBS mit 1 % (w/v) Casein inkubiert. Danach wurde nach oben genannten Bedingungen gewaschen und die Membran für mindestens 1 Stunde mit dem zweiten Antikörper in 1 x TBS mit 1 % (w/v) Casein geschwenkt. Zur Entfernung des Antikörpers wurde 4-mal jeweils 10 min mit 1 TBST/T-Puffer gewaschen. Für die Entwicklung des *Western Blots* wurden 2 ml Immobilon-Entwicklerflüssigkeit (Merck Millipore) frisch angesetzt, gleichmäßig auf die Membran gegeben und 2 - 5 min inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde verworfen, die Membran in Frischhaltefolie gepackt und in einer Entwicklerkassette fixiert. Die Merretich-Peroxidase der Entwicklerlösung katalysiert mit Hilfe von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol. Die daraus entstehende Chemielumineszenz wurde durch Auflegen von Röntgenfilmen zu verschiedenen Expositionszeiten und nachfolgende Entwicklung mit der Agfa Curix 60 Maschine (Agfa, Berlin) detektiert.

Tab. 27: Übersicht über die eingesetzte Verdünnung der im *Western Blot* verwendeten Antikörper (Merretich Peroxidase gekoppelt)

Antikörper	Verdünnung	Quelle
<u>Primärantikörper</u>		
anti-Strep	1:500	Qiagen
anti-his (Tetra)	1:1.000	Qiagen
<u>Sekundärsantikörper</u>		
anti-mouse-HRP	1:10.000	Dianova

3.4.3 Autoradiographie

Da in einigen der durchgeführten Versuche die Methodik des immunochemischen Detektion (*Western Blot*) nicht sensitiv genug war, wurde alternativ noch die Methodik der Autoradiographie verwendet. Bei dieser wird die radioaktive Aminosäure Methionin (³⁵S-Methionin, Hartmann Analytics) in das zu analysierende Protein eingebaut. ³⁵S ist ein Radionuklid, welches β -Strahlung aussendet. Diese kann von einem *Imaging Plate* aufgenommen und mittels eines speziellen Lesegerätes sichtbar gemacht werden.

Die mittels dieser Methode zu analysierenden Proben wurden wie unter 3.2.8 beschrieben vorbereitet. Im Anschluss wurden die Proben mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend 30 min leicht in Fixierlösung (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) geschwenkt. Das Gel wurde anschließend auf Whatman-Papier transferiert, in einem Gel-Trockner mit Saran-Folie abgedeckt und für 1 h bei 75°C getrocknet. Das trockene Gel wurde in neue Folie eingeschlagen, in einer Röntgenkassette fixiert und ein *Imaging Plate* über Nacht aufgelegt. Im Anschluss wurde das *Imaging Plate* in einem BasReader (FLA-2000, Raytest) abgescannt und die Bilder mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer umgespeichert. Die auf diese Weise erhaltenen Abbildungen konnten für die weitere Analyse eingesetzt werden.

3.4.4 Isolierung von Proteinen aus *E. coli*

3.4.4.1 Isolierung von Proteinen aus dem Periplasma von *E. coli* im präparativen Maßstab

Aus einer Einzelkolonie des entsprechenden Produktionsstamm wurde eine 50 ml Vorkultur in mit Antibiotikum komplementiertem LB-Medium hergestellt. Von dieser Kultur wurden 10 – 15 ml verwendet, um eine 1 l Kultur von mit Antibiotikum komplementiertem LB-Medium anzupflanzen und diese bei 37°C auf einem Schüttler bei 115 Upm zu inkubieren. Zur besseren Belüftung der Kultur wurden 3 l-Schikanekolben verwendet. Bei einer OD₆₀₀ von 0,2 – 0,25 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe des Induktors Tetrazyklin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml gestartet. Wegen der Tetrazyklin-Resistenz des verwendeten Stammhintergrundes konnte dieses Antibiotikum verwendet werden. Das weitere Wachstum erfolgte bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von mindestens 1. Im Anschluss wurden die Zellen in gekühlten Zentrifugenbechern geerntet (Avanti, 9.000 Upm, 15 min, 4°C). Ab diesem Punkt wurde immer auf Eis und mit gekühlten Puffern gearbeitet, um die Stabilität der Proteine zu gewährleisten. Das Zellpellet wurde in 50 – 100 ml Sucrose-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (Avanti, 9.000 Upm, 10 min, 4°C) wurde das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt und diese in 10 ml Sucrose-Puffer pro Gramm Feuchtgewicht aufgenommen. Nach Zugabe von

METHODEN

Lysozym (Endkonzentration 10 µg/ml) und 0,5 M EDTA, pH 8,0 (Endkonzentration 1 mM) folgte ein 30minütige Inkubation. Die dadurch destabilisierte äußere Membran wurde durch Zufügen von 1 M MgSO₄ (Endkonzentration 20 mM) wieder stabilisiert. Durch anschließende Zentrifugation (Avanti, 14.000 Upm, 30 min, 4°C) wurden unlösliche Proteine und Spherolblasten entfernt und der klare Überstand mit der periplasmatischen Fraktion in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde dies auf Eis gelagert.

3.4.4.2 Isolierung von Proteinen aus dem Cytoplasma von *E. coli* im präparativen Maßstab

Die Produktion und Isolation der Proteine aus dem Cytoplasma erfolgte weitgehend wie unter 3.4.4.1 für die Isolierung aus dem Periplasma beschrieben. Zusätzliche wurde nach der Destabilisierung der äußeren Membran durch Lysozym und EDTA auch die innere Membran aufgeschlossen. Hierzu wurde die Zellsuspension nach der 30minütigen Inkubation auf Eis in ein 50 ml Tube BigB Lysing Matrix (MP Biochemicals) überführt. Der Zellaufschluss erfolgte in einem Zellhomogenisator (Fast Prep®-24, MP) in 4 Zyklen bei Stufe 6,0 für 30 sek mit jeweils 5 min Pause auf Eis. Nach Entfernung der BigB Lysing Matrix (Heraeus Multifuge, 4.000 Upm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand nochmals zentrifugiert (Avanti, 14.000 Upm, 30 min, 4°C). Der geklärte Überstand wurde in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.4.4.3 Isolierung von *pBPA*-Proteinen aus dem Periplasma von *E. coli* im präparativen Maßstab

Aus einer Einzelkolonie des mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Produktionsstammes YM10219 wurde eine 50 ml Vorkultur in mit Antibiotikum komplementiertem LB-Medium hergestellt. Von dieser Kultur wurden 20 ml abzentrifugiert (Heraeus Multifuge, 4000 Upm, 10 min) und das Pellet in 5 ml LB-Medium resuspendiert. 1 l LB-Medium wurde in einem 3 l Schikanekolben für ca. 1 h bei 37°C vorgewärmt. Dieser Schritt ist wichtig, da *pBPA* ausfällt, wenn das Medium kalt ist oder der Kolben nicht direkt nach der Zugabe geschwenkt wird (eigene Beobachtungen & [Farrell *et al.*, 2005]). Nach Komplementierung mit den Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) und Chloramphenicol (25 µg/ml) und der unnatürlichen Aminosäure *pBPA* (0,2 mM), wurde das Medium beimpft und die Kultur bei 37°C auf einem Schüttler (115 Upm) inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe der Induktoren Arabinose (0,2 %, für *pEVOL-pBpF*) und Tetrazyklin (10 µg/ml, für *pASK*-Vektoren) gestartet. Wegen der Tetrazyklin-Resistenz des verwendeten Stammhintergrundes konnte dieses Antibiotikum verwendet werden. In eigenen Versuchen hat sich gezeigt, dass man eine höhere Protein-Ausbeute erhielt, wenn beide Induktoren zugesetzt wurden. Das weitere Wachstum erfolgte über Nacht (ca. 14h) bei 30°C und 115 Upm.

Die nachfolgende Präparation der *pBPA*-haltigen Proteine erfolgte wie unter 3.4.3.1 (Periplasma) bzw. 3.4.3.2 (Cytoplasma) beschrieben.

3.4.5 Reinigung von Proteinen

3.4.5.1 Reinigung über immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Aufreinigung über immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) erfolgte für Proteine mit einer terminalen Oligohistidinsequenz. Hierzu wurden ca. 4 ml Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia) zweimal mit mindestens 10 ml H₂O_{dd} gewaschen. Anschließend wurde die Säulenmatrix mit 1 Vol 100 mM Nickelchlorid-Lösung schwenkend 5 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit mindestens 10 ml H₂O_{dd} folgte die Äquilibration mit Sucrose-Puffer. Die Bindung der in Sucrose-Puffer gelösten Proteine an die vorbereitete Säulenmatrix erfolgte über Nacht kühl schwenkend.

Am nächsten Tag wurde diese Suspension in eine leere Säule gegeben. Zunächst wurde die Säulenmatrix mit den gebundenen Proteine mit jeweils 250 ml Puffer A, pH 8,0 mit 0, 5 bzw. 10 mM Imidazol gewaschen. Anschließend wurden die Proteine schrittweise durch steigende Imidazol-Konzentration in Puffer A, pH 8,0 eluiert. Die Elution erfolgte mit je 15 ml 15, 20 und 40 mM sowie je 10 ml 80, 150 und 300 mM und 5 ml 500 mM Imidazol. Aliquots ausgewählter Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert. Die Säulenmatrix wurde wie beschrieben regeneriert, bevor sie wieder verwendet werden konnte.

3.4.5.2 Proteinreinigung mittels Gelfiltrations-Chromatographie

Zur weiteren Reinigung der Proteine und um ein Dialysieren zu vermeiden, wurde zusätzlich zur IMAC-Reinigung eine Gelfiltrations-Chromatographie durchgeführt. Diese Art der Reinigung beruht auf dem Prinzip der Auftrennung nach Molekülgröße. Die verwendete Säulenmatrix (Superdex, GE Healthcare) besteht aus einem aus vernetztem Dextran und Agarose porenhaltigen Material, welches ein längere Verweildauer von kleineren Molekülen bedingt [Kågedal, 1991]. So werden kleinere Moleküle später eluiert als größere Moleküle, die nicht so tief in die Matrix eindringen können. Dieses Verfahren stellt eine schonende Möglichkeit zur Reinigung von Proteinen dar, da im Gegensatz zu HPLC-Methoden keine Denaturierung der Proteine stattfindet und das Protein in einem adäquaten Puffer ohne zusätzliche Lösungsmittel eluiert wird.

Für die Auftrennung wurde eine Superdex 200 10/30 Säule (GE Healthcare) an eine Äkta Explorer (GE Healthcare) angeschlossen, die den Puffer über die Säule gepumpt hat. Es wurden 250 bzw. 500 µl Fraktionen gesammelt, mittels SDS-PAGE analysiert und die Protein enthaltenden Fraktionen eingengt.

Für die SurA-Variante SurA_H68C-Thrombin-His wurde die Gelfiltrationssäule mit Thrombinspaltpuffer äquilibriert und die Gelfiltration, sowie die Analyse per SDS-PAGE, wie oben beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden die SurA-Fraktionen vereinigt und über Nacht die Spaltung durch Thrombin durchgeführt, um den C-terminalen His-tag des Proteins zu entfernen. Ungespaltene SurA-His-Proteine und der abgespaltene His-tag wurden durch IMAC entfernt. Das Thrombin wurde durch Bindung an pABA entfernt. Die Proben wurden danach über Nacht gegen Puffer A, pH 8,0 dialysiert.

3.4.5.3 Konzentration von Proteinlösungen mit Centriprep-Konzentratoren

Um Proteinlösungen unter nicht-denaturierenden Bedingungen einzukonzentrieren, wurden Centriprep-Konzentratoren unterschiedlichen Volumens mit einer adäquaten molekularen Ausschlussgröße eingesetzt. Die einzuengende Proteinlösung wurde direkt auf die Membran des Centriprep-Konzentrators (Millipore) gegeben und nach Herstellerangaben bis zum gewünschten Volumen in einer Heraeus Multifuge bei 4°C zentrifugiert.

3.4.5.4 Dialyse von Proteinlösungen

Für die Umpufferung einer Proteinlösung wurde diese in einen Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 12.000 M (Roth) überführt, fest verschlossen und über Nacht im Kühlraum im 1.000fachen Volumen des gewünschten Puffers leicht gerührt.

3.4.5.5 Lagerung der SurA-Proteine

Die gereinigten Proteine wurden als wässrige Lösung in Eppendorf Reaktionsgefäßen für einige Tage bis Wochen auf Eis gelagert.

3.5 Spektroskopische Arbeitsmethoden

3.5.1 Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie von MTSSL-markierten SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteinen

3.5.1.1 Theoretischer Hintergrund der ESR-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Interaktion von spezifischen Peptiden mit SurA und zur Identifikation von Peptid-Bindestellen auf der Oberfläche des SurA-Proteins wurde die Methode der Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie (auch Elektronenparamagnetischeresonanz (EPR)-Spektroskopie genannt) verwendet. Mit ihrer Hilfe können die Struktur und konformationelle Änderungen unter nahezu nativen Bedingungen untersucht werden [Altenbach *et al.*, 1989; Altenbach *et al.*, 1990]. Für die ESR-Spektroskopie ist es notwendig die Proteine mit einer Radikalsonde zu markieren. Dies geschieht ortsspezifisch an hierfür gezielt in das Protein eingeführten Cystein-Resten [Pfeiffer *et al.*, 1999]. Für diese auch *site directed spin labeling* (SDSL) genannte Methode sind besonders Proteine mit Primärsequenzen ohne Cystein geeignet [Millhauser *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 1999; Columbus and Hubbell, 2002], zu denen auch das SurA-Protein gehört. Nach Auswahl der zu untersuchenden Positionen anhand der Kristallstruktur von SurA wurden die vorhandenen Aminosäuren durch Cystein substituiert. An dieses wurde über eine Thiolbindung die Radikalsonde (1-oxyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrroline-methyl) Methanthiosulfonat (MTSSL, [Stone *et al.*, 1965; Berliner *et al.*, 1982]) kovalent gebunden [Kirby *et al.*, 2004] (Abb. 6). Diese paramagnetische Verbindung ist aufgrund ihrer relativ geringen molekularen Größe, vergleichbar zu der einer Tryptophan-Seitenkette, für diese Anwendungen sehr beliebt.

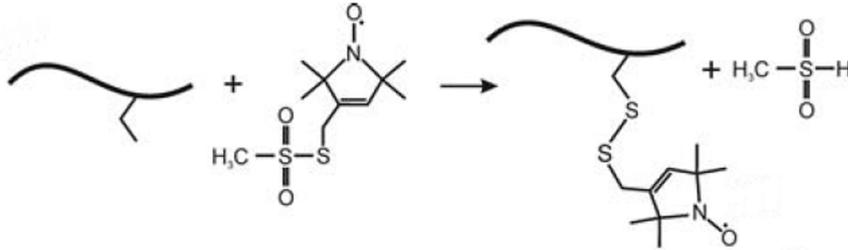


Abb. 6: Reaktion der Radikalsonde (1-oxyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrroline-methyl) Methanthiosulfonat (MTSSL) mit der SH-Gruppe des Cysteins (kovalente Thiol-Kopplung). (Abb. modifiziert nach [Klare and Steinhoff, 2009])

MTSSL besitzt ein freies Elektron am Stickstoff-Atom, mit dessen Hilfe die nähere Umgebung der Radikalsonde analysiert werden kann [Owenius *et al.*, 1999]. In der ESR-Spektroskopie liefert das freie Elektron bei Bestrahlung mit Mikrowellen in einem angelegten Magnetfeld ein charakteristisches Resonanzsignal bzw. Spektrum.

Über die Mobilität der Sonde können daher spezifische Informationen über Bindungen z.B. eines Peptides an ein Protein oder Konformationsänderungen innerhalb eines Proteins erhalten werden, wobei hierbei die Änderung des Immobilisationsgrades der Radikalsonde entscheidend ist [Steinhoff, 2004]. Durch Substratbindung in der direkten Umgebung der Sonde MTSSL ist eine Abnahme ihrer Mobilität zu erwarten, die in einem verbreiterten Spektrum resultiert. Des Weiteren können Peptid-Interaktionen auch zu lokalen und globalen strukturellen Änderungen, die in einer Verringerung des Immobilisationsgrades sichtbar werden, führen [Svensson *et al.*, 1995; Hubbell *et al.*, 1998; Hubbell *et al.*, 2000]. Diese indirekten Änderungen sind beispielsweise durch die Bindung eines Peptides an anderer Stelle im Protein hervorgerufene Konformationsänderungen [Wegener *et al.*, 2001].

Die ESR-Spektroskopie ist auf das Vorhandensein eines ungepaarten Elektrons, eines sogenannten paramagnetischen Zentrums, angewiesen [Freifelder, 1982]. Bei diamagnetischen chemischen Verbindungen ist das magnetische Nettomoment gleich null, da diese nur über gepaarte Elektronen verfügen. Chemische Verbindungen mit einem freien, ungepaarten Elektron (Radikal) nennt man paramagnetisch, da bei diesen das magnetische Moment der Elektronenspins innerhalb des Orbitals nicht durch eine Spinpaarung mit entgegengesetztem magnetischem Moment aufgehoben werden. Nur diese paramagnetischen Zentren sind mittels der ESR-Spektroskopie detektierbar [Mortimer, 2001].

Die angenommene ständige Drehung von Elektronen um die eigene Achse (Eigendrehimpuls) wird Spin genannt. Durch diese kreisende Bewegung wird das magnetische Moment μ_e erzeugt, welches zwei räumliche Orientierungen annehmen und mit einem äußeren Magnetfeld interagieren kann [Hoppe, 1982] (Abb. 7a). Der Spin kann die Spinquantenzahl $m_s = -1/2$ und $m_s = +1/2$ besitzen. Die Anlegung eines äußeren Magnetfeldes führt zu einer Aufspaltung der Energieniveaus des Elektronenspins, wobei sich die Spins parallel oder antiparallel zur Ausrichtung des Magnetfeldes orientieren [Freifelder, 1982; Mortimer, 2001]. Hierbei haben parallel ausgerichtete Elektronen ($m_s = -1/2$) eine niedrigere Energie als Elektronen mit antiparalleler Ausrichtung ($m_s = +1/2$). Durch Einstrahlung von elektromagnetischer Energie in eine Probe mit einem freien Radikal werden Übergänge zwischen den beiden möglichen Energieniveaus der

Spinquantenzahlen induziert. Für diese auch Resonanzbedingung genannte Energiedifferenz ΔE folgt nach der Quantentheorie für die Absorption von Strahlung beim Übergang:

$$h\nu = \Delta E = g_e * \beta * B$$

wobei g_e der Landé-(Aufspaltungs-) Faktor ist, der für ein freies Elektron einen Wert von 2,00232 besitzt [Hoppe, 1982; Kurad *et al.*, 2003], β ist das Bohr'sche Magneton ($9,27400968 * 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$), B steht für das Magnetfeld (nach [Hoppe, 1982; Atkins, 2006]).

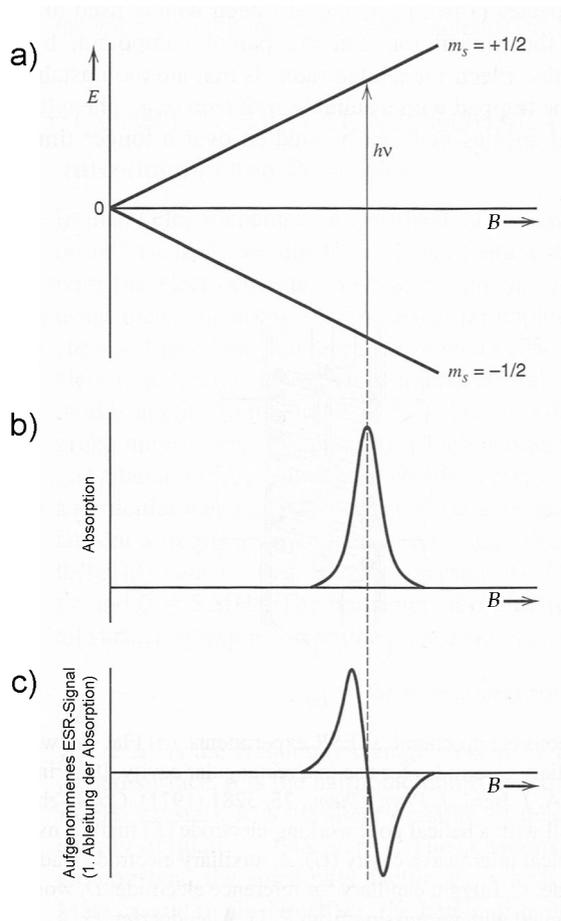


Abb. 7: Prinzip der ESR-Spektroskopie zur Erstellung eines ESR-Spektrums. (modifiziert nach [Bard, 2001] **a**) Diagramm des Energie-Niveaus des freien Elektrons innerhalb des Magnetfeldes B. Die Anlegung eines äußeren Magnetfeldes führt zu einer Aufspaltung der Energieniveaus des Elektronenspins, wobei sich die Spins parallel oder antiparallel zur Ausrichtung des Magnetfeldes orientieren [Freifelder, 1982; Mortimer, 2001]. Hierbei haben parallel ausgerichtete Elektronen ($m_s = -1/2$) eine niedrigere Energie als Elektronen mit antiparalleler Ausrichtung ($m_s = +1/2$). Das ESR-Spektrum wird in zwei Schritten erstellt. Zunächst wird die Absorption der Mikrowellen bei einer Änderung des angelegten Magnetfeldes B detektiert (**b**). Die graphische Darstellung des Spektrums entspricht der 1. Ableitung der detektierten Absorption nach der Feldstärke [Atkins, 2006] (**c**).

Die Resonanzbedingung ist die Grundgleichung der ESR-Spektroskopie und gibt die zur Anregung erforderliche elektromagnetische Strahlung an, d.h. im Prinzip misst die ESR-Spektroskopie die Energie, die aufgebracht werden muss, um den Spin eines ungepaarten Elektrons umzukehren [Banwell, 1999].

Bei der ESR-Spektroskopie wird die Probe in der Regel einem Magnetfeld von 3000 Gauß (entspricht 0,3 Tesla) ausgesetzt. Die Induktion der Resonanz wird durch den Einsatz elektromagnetischer Strahlung aus dem X-Band Mikrowellenbereich einer Frequenz von $\nu = 9 \text{ GHz}$ mit einer Wellenlänge von $\lambda = 3 \text{ cm}$

METHODEN

erreicht. Das ESR-Spektrum wird in zwei Schritten erstellt. Zunächst wird die Absorption der Mikrowellen bei einer Änderung des angelegten Magnetfeldes detektiert (Abb. 7b). Daraus geht dann die graphische Darstellung des Spektrums als 1. Ableitung der detektierten Absorption nach der Feldstärke hervor [Atkins, 2006] (Abb. 7c).

Die Aufspaltung des Spektrums der freien Radikalsonde in drei Linien gleicher Intensität (Abb. 13b) lässt sich durch das ungepaarte Elektron im $2p$ π -Orbital des Stickstoff-Atoms erklären. Bedingt durch die Konfiguration des Stickstoff-Kerns (^{14}N : $1s^2 2s^2 2p_x^1 2p_y^1 2p_z^1$, Spinquantenzahl: $I = 1$) sind drei Spinorientierungen möglich, die jeweils von einem Drittel der Radikale einer Probe eingenommen werden. Der energiegleiche Grundzustand der drei p -Orbitale wird auch als *entartet* bezeichnet. Diese *Entartung* kann durch das Anlegen eines äußeren magnetischen Feldes aufgehoben werden, was sich in einer Hyperfeinaufspaltung der Spektrallinien äußert (Zeeman-Effekt), solange sich die Probe im Magnetfeld befindet [Mortimer, 2001]. Bei einem Kern mit der Spinquantenzahl $I = 1$ wird, bedingt durch die Anzahl der möglichen Orientierungen, ein ESR-Spektrum in $2I+1$ Hyperfeinstruktur-Linien gleicher Intensität erhalten [Freifelder, 1982].

Eine näherungsweise quantitative Beschreibung der Hyperfein-Aufspaltung der Spektren liefert der Hamilton-Operator (nach [Hoppe, 1982]):

$$H = |\beta| * SgB_0 + hSTI$$

mit S , I und B_0 als Vektoren des Elektronenspins (S), des Kernspins (I) und des äußeren Magnetfeldes (B_0). h ist die Planck-Konstante ($6,62606957 * 10^{-34}$ J s) und β das Bohr'sche Magneton ($9,27400968 * 10^{-24}$ J T $^{-1}$). g ist der Tensor des Proportionalitätsfaktors g (auch Landé-Faktor). Dieser Faktor ist oft anisotrop, d.h. orientierungsabhängig, und sein Wert hängt von der Elektronenkonfiguration des zu untersuchenden Radikals ab. Für freie Radikale liegt der Wert bei 2,00232. Der T -Tensor beschreibt die anisotrope Hyperfein-Wechselwirkung [Hoppe, 1982].

Mit den beiden Tensoren g und T wird im Hamilton-Operator die Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons und des Kernspins als Hyperfein-Aufspaltung berücksichtigt. Der g -Faktor und die Hyperfein-Wechselwirkung sind sehr empfindlich gegenüber der gegenseitigen Orientierung des Magnetfeldes und des $2p$ π -Orbitals [Hoppe, 1982], in dem das ungepaarte Elektron der Radikalsonde lokalisiert ist (s.o.; [Kurad *et al.*, 2003]). Im Laborsystem wird eine Ausrichtung in z -Richtung angenommen [Wegener, 2000; Kurad *et al.*, 2003], was bedeutet, dass sich die Längsachse der Sonde auf der z -Achse des $2p$ π -Orbitals befindet. Die Extremverläufe der Orientierungen äußern sich durch charakteristische Signalverläufe der Spektren. Bei einer Orientierung des Magnetfeldes B_0 senkrecht zur z -Achse wird ein scharfes Triplettpektrum erhalten, welches die völlige Mobilität des Elektrons und dessen schnelle Rotation darstellt (Abb. 8b). Herrscht ein immobilisierter Zustand vor, so ist das Magnetfeld parallel zur z -Achse des Elektrons ausgerichtet und stellt sich durch wesentlich verbreiterte *peaks* dar (Abb. 8a) [Hoppe, 1982].

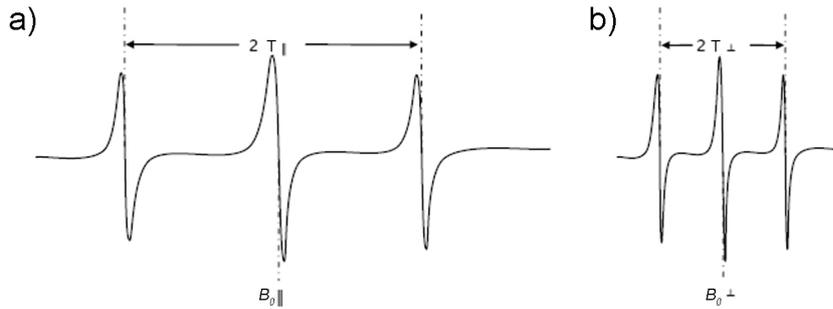


Abb. 8: Schematische Darstellung der Anisotropie (Richtungsabhängigkeit) einer Nitroxid-Radikalsonde im ESR-Spektrum. (modifiziert nach [Hoppe, 1982] **a)** Bei völliger Immobilisierung der Sonde ist das Magnetfeld B_0 parallel zur z-Achse des $2p$ π -Orbitals ausgerichtet, was durch Umweltveränderungen, bei denen der Beitrag der anisotropen Hyperfein-Wechselwirkung (T -Tensor) ansteigt, verursacht wird. Dies äußert sich in einer Verbreiterung der *peaks*. Beeinflussende Faktoren können die Polarität des Lösungsmittels, der pH-Wert oder auch Interaktionen mit benachbarten Atomen sein. **b)** Ist die Radikalsonde in einem freien Zustand und nur sehr wenigen umgebenden Einflüssen ausgesetzt, so ist auch der T -Tensor gering. In diesem Fall orientiert sich das Magnetfeld senkrecht zur z-Achse des $2p$ π -Orbitals. Dies wird durch ein scharfes Triplett-Spektrum gekennzeichnet.

Die Änderungen der Spektren resultieren aus Wechselwirkungen mit der Umwelt. Diese werden durch Veränderungen des T -Tensors, der von der anisotropen Hyperfein-Wechselwirkung bestimmt wird, determiniert. Faktoren, die darauf Einfluss haben, sind die Viskosität des Mediums, der pH-Wert, Interaktion mit benachbarten Seitenketten und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen [Hoppe, 1982; Wegener, 2000; Hammarström *et al.*, 2001; Kurad *et al.*, 2003; Steinhoff, 2004].

Mit der Methode der ESR-Spektroskopie können über die positionsspezifische Mobilität der Nitroxid-Seitenkette einer Radikalsonde sowohl ortstypische Informationen über Bindungen oder Konformationsänderungen (zusammengefasst u.a. in [Hubbell *et al.*, 1998; Hubbell *et al.*, 2000; Klare and Steinhoff, 2009]), als auch Erkenntnisse über die Beschaffenheit und die Sekundär- und Tertiärstruktur der näheren Umgebung der Sonde erhalten werden [Pfeiffer *et al.*, 1999].

3.5.1.2 Markierung von SurA-Cys-Proteinen mit der Radikalsonde MTSSL

Die SurA-Cys-Proteine wurden an Nickel-Sepharose gebunden. Um die Anzahl der durch intermolekulare Disulfidbrücken vorhandenen Dimere zu verringern wurden die gebundenen Proteine mit 5 mM Dithiothreitol (DTT) in Puffer A, pH 6,7 1 h bei Raumtemperatur reduziert und anschließend gewaschen (Puffer A, pH 6,7). In diesem immobilisierten Zustand wurden die Proteine in Gegenwart von 1 mM (1-oxyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrroline-methyl) Methanthiosulfonat (MTSSL; [Stone *et al.*, 1965; Berliner *et al.*, 1982]) in Puffer A, pH 6,7 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Schritt wird die Radikalsonde MTSSL kovalent über eine Disulfidbrücke an die SH-Gruppe des Cysteins positionsspezifisch gebunden (Abb. 13a). Nach ausgiebigem Waschen mit Puffer A (250 ml, pH 8,0) wurden die markierten SurA-Cys-Proteine nach Protokoll von der Säule eluiert (IMAC, 3.4.5.1, modifiziert nach [Kweon *et al.*, 2003]).

Proteinhaltige Fraktionen wurden mit Centriprep-Konzentratoren auf ein Volumen von weniger als 500 μ l einkonzentriert. Ungebundenes MTSSL, Dimere und Verunreinigungen wurden anschließend mittels

METHODEN

Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex 200 10/30, GE Healthcare) entfernt [Qin and Squier, 2001]. Die gereinigten MTSSL-markierten SurA-Cys-Proteine wurden dann für die ESR-spektroskopische Untersuchung eingesetzt.

3.5.1.3 Markierung von SurAI-Cys-Proteinen mit der Radikalsonde MTSSL

Die SurAI-Cys-Proteine wurden laut Protokoll im Cytoplasma von *E. coli* produziert und über IMAC gereinigt. Bei den Cys-Varianten der isolierten PPIase Domäne I von SurA kam es zu einer wesentlich stärkeren Dimerisierung der Proteine als bei den SurA-Cys-Mutanten. Aus diesem Grund wurde DTT durch das potentere (und geruchlose) Reduktionsmittel TCEP ersetzt [Han and Han, 1994; Getz *et al.*, 1999]. Die einkonzentrierten Proteine wurden über Nacht gegen 1 mM Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP) in Puffer A, pH 6,7 dialysiert.

Zur Entfernung des Reduktionsmittels wurde die auf 2,5 ml konzentrierte Proteinlösung auf eine mit Puffer A, pH 6,7 äquilibrierte Nap10-Säule (Sephadex G-25, GE Healthcare) gegeben. Die Elution erfolgte mit 3,5 ml Puffer A, pH 6,7 in ein Gefäß, in dem ein Aliquot der Radikalsonde MTSSL vorgelegt war. Dies hat sich als vorteilhaft erwiesen, um eine Oxidation und damit erneute Dimerisierung der Proteine zu minimieren. Für die Kopplungsreaktion der Radikalsonde MTSSL an die SurAI-Proteine wurde der Ansatz zusätzlich über Nacht auf Eis und im Dunkeln inkubiert.

Die weitere Reinigung der MTSSL-markierten SurAI-Cys-Proteine erfolgte mittels Gelfiltration wie unter 3.5.1.2 für die SurA-Cys-Proteine beschrieben. Da eine vollständige Entfernung der Dimere oft dennoch nicht möglich war, wurden Fraktionen, die laut SDS-PAGE-Analyse größere Mengen an Dimer aufwiesen, verworfen. Die auf diese Weise gereinigten MTSSL-markierten SurAI-Cys-Proteine wurden dann für die ESR-spektroskopische Untersuchung eingesetzt.

3.5.1.4 Messung des Immobilisationsgrades der Radikalsonde MTSSL nach ortsspezifischer Kopplung an SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteine

Ca. 25 – 40 µl der Lösung mit gereinigten MTSSL-markierten SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteinen wurde über den Kapillareffekt in eine Glaskapillare aufgesaugt. Mit einem Bunsenbrenner wurde das gegenüberliegende freie Ende der Glaskapillare erhitzt und auf diese Weise verschlossen. Nach vorsichtigem Abkühlen der Kapillare wurde die Proteinlösung durch kurzes, aber vorsichtiges Schütteln auf den versiegelten Boden gebracht. Anschließend wurde auch das obere Ende der Glaskapillare versiegelt. Die vorbereiteten, mit der Proteinlösung befüllten Kapillaren wurden bis zur Messung auf Eis gelagert.

Für die Messung wurde die zu untersuchende Glaskapillare behutsam in ein Quarz-Röhrchen gestellt und dieses mit der Spitze des Röhrchens mittig in den ca. 3 cm hohen Messbereich des Probenraums des ESR-Gerätes (Varion X-Band ESR Spektrometer) eingesetzt. Die Messungen wurden bei 21°C mit Mikrowellenstrahlung von 9,118 GHz bei 5 bis max. 20 mW bei einem angelegten magnetischen Feld von 3195 bis 3295 Gauß durchgeführt. Die Messungen wurden je Probe 3- bis 4-mal wiederholt. Die Daten der erhaltenen Spektren wurden mit der Software IGOR bzw. Origin umgewandelt (freundlicherweise durchgeführt von B. Angerstein, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen), so dass die

Daten in MS Excel bzw. SigmaPlot importiert werden konnten. Mit Hilfe dieser Programme wurden die im Ergebnisteil dargestellten Abbildungen erstellt. Die Durchführung und Auswertung der ESR-Spektroskopie erfolgte in Kooperation mit Dr. Derek Marsh und Brigitta Angerstein am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen.

3.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Interaktion von SurA-Proteinen mit ausgewählten Peptiden wurde mittels der Methode der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Hierbei waren die Peptide mit 2-(4-iodoacetamido) Anilino-Naphtalen-6-Sulfonsäure (IAANS) fluoreszenzmarkiert. Als Fluoreszenz wird die Emission einer energieärmeren Wellenlänge bezeichnet, die, nach Anregung einer für das Fluorophor spezifischen Wellenlänge, gemessen wird. Daher wird im Allgemeinen die Fluoreszenzintensität oder auch Quantenausbeute Q als der Quotient aus dem Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen angegeben. Von extrinsischer Fluoreszenz spricht man, wenn das Fluorophor, durch chemische Synthese oder Interaktion, an ein zu analysierendes Molekül gebunden wird.

IAANS (2-(4-iodoacetamido) Anilino-Naphtalen-6-Sulfonsäure) ist ein Derivat des Fluorophors 1-Anilino-Naphtalen-Sulphonat (ANS, [Stryer, 1965]). Fluorophore dieser Art sind für Bindungsstudien besonders geeignet, da sie in wässriger Lösung eine relative geringe Fluoreszenz aufweisen und das Überführen des Fluorophors in eine weniger polare Umgebung zu einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität führt [Freifelder, 1982]. Dies wurde schon in diversen Publikationen für die Analyse der Interaktion von IAANS-markierten Peptiden mit Proteinen gezeigt [McCarty *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 2000; Patzelt *et al.*, 2001]. So soll durch Messung der extrinsischen Fluoreszenz die Bindung von Peptiden an das SurA-Protein untersucht werden. Im Falle einer Bindung des markierten Peptides an SurA wird die Quantenausbeute Q ansteigen.

Studien zur Spezifität und Affinität der SurA-Substrat-Interaktionen wurden in der Dissertation von Gerrit Hennecke durchgeführt [Hennecke, 2006]. Anhand der dort etablierten Methodik und der in der Arbeit veröffentlichten Peptide wird hier untersucht, inwieweit eine Cystein-Mutante der isolierten Domäne I von SurA noch in der Lage ist, Peptid zu binden.

Die Analyse der Interaktion des isolierten Domäne I von SurA (SurAI) wurde mit dem IAANS-markierten, SurA-bindenden Peptid Pep46 (DVHMIDFYWDISC) aus der Lamb-Bibliothek durchgeführt. Das Peptid Pep46-IAANS lag schon in der Arbeitsgruppe vor.

Für die Ansätze zur Untersuchung der Komplexbildung von SurA mit den markierten Peptiden wurde gereinigtes SurA-Protein (400 nM) mit Pep46-IAANS für 1 h bei 30°C in F-Puffer [Patzelt *et al.*, 2001] inkubiert. Nach Anregung bei 335 nm wurde das Emissionsspektrum im Bereich von 350 – 600 nm aufgezeichnet (Spektrofluorophotometer RF-5301 PC, Shimadzu). Die erhaltenen Daten wurden zur weiteren Analyse in MS Excel importiert. Die dargestellten Fluoreszenzintensitäten sind die Differenz zwischen den gemessenen Werten und der Fluoreszenzintensität des markierten Peptides ohne die Zugabe von Protein [McCarty *et al.*, 1996].

3.5.3 ToxR-Assay

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde als genetisches Indikatorsystem das ToxR-System verwendet. ToxR ist ein Produkt des *toxRS*-Operons, welches die Expression von Virulenzgenen in *Vibrio cholerae* reguliert [DiRita, 1992]. Im Gegensatz zur indirekten transkriptionellen Aktivierung der *ctxAB*-Gene in *V. cholerae* [DiRita *et al.*, 1991; Higgins *et al.*, 1992], wird im heterologen Wirt *Escherichia coli* die Transkription über den *ctx*-Promotor direkt aktiviert [Miller and Mekalanos, 1984]. Hierbei ist zu beachten, dass der Transkriptionsaktivator nur in dimerisierter Form an den *ctx*-Promotor bindet. Um diese Transkriptionsaktivierung bestimmen zu können, verfügt der für die Messungen verwendete Stamm FHK über eine chromosomale *ctx::lacZ* Reporterfusion.

Das ToxR-Protein ist mit einem Transmembransegment in der inneren Membran verankert und verfügt über einen cytoplasmatischen N-Terminus, sowie einen periplasmatischen C-Terminus (Abb. 9). Der C-Terminus kann gegen das zu untersuchende Protein substituiert werden, ohne dass die Transkriptionsaktivierung des *ctx*-Promotors beeinträchtigt wird [Kolmar *et al.*, 1995]. Gibt es keine Interaktion zwischen den Fusionsproteinen, d.h. sie liegen als Monomer vor, ist der N-terminale Transkriptionsaktivator inaktiv (Abb. 9 links). Kommt es jedoch zu einer Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der Fusionsproteine und somit zu einer Dimerisierung des Transkriptionsaktivators, bindet dieser an den *ctx*-Promotor. Diese Bindung induziert die Transkription des fusionierten *lacZ*-Gens und führt so zur Produktion von β -Galaktosidase (Abb. 9 rechts).

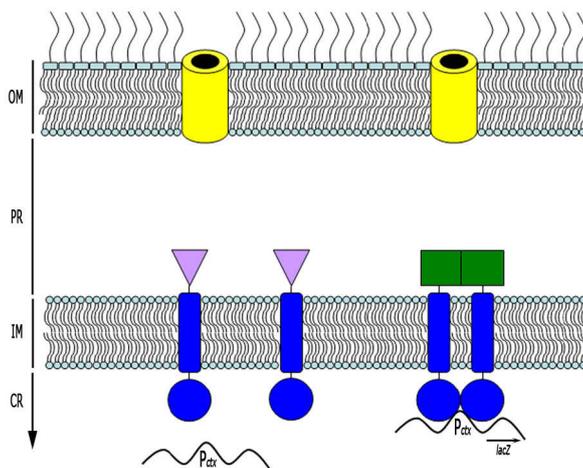


Abb. 9: Schematische Darstellung des ToxR-basierten genetischen Indikatorsystems zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen in *Escherichia coli* (modifiziert nach [Hennecke *et al.*, 2005a]). Das ToxR-Protein besteht aus einer in der inneren Membran verankerten Transmembrandomäne, einem N-terminalen Transkriptionsaktivator im Cytoplasma und einem periplasmatischen C-Terminus. Der Transkriptionsaktivator (blauer Kreis) kann nur als Dimer an den *ctx*-Promotor binden und somit die Transkription des *lacZ*-Gens innerhalb der chromosomalen Reporterfusion induzieren. Der C-Terminus kann gegen das zu untersuchende Protein substituiert werden. Kommt es zu keiner Interaktion der Fusionsproteine (lila Dreiecke), so bleibt auch der Transkriptionsaktivator in seiner monomeren Form und damit inaktiv. Kommt es jedoch zu einer Dimerisierung der Fusionsproteine (grüne Vierecke) und hiermit auch zu einer Dimerisierung des Transkriptionsaktivators, so kann dieser an den *ctx*-Promotor binden und die Transkription des fusionierten *lacZ*-Gens induzieren.

METHODEN

Durch den Umsatz von *o*-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (oNPG) durch β -Galaktosidase entsteht Galaktose und das gelbgefärbte *o*-Nitrophenol. Anhand der Intensität der Gelbfärbung ist ein Rückschluss auf die Aktivität der β -Galaktosidase möglich [Miller, 1972].

Für jede Versuchsreihe wurden vergleichbare Mengen der benötigten Plasmide frisch in den Stamm FHKs transformiert (3.1.4) und auf Platten mit Ampicillin (100 μ g/ml) und Chloramphenicol (25 μ g/ml) selektiert. Von jeder Platte wurden 5 Kolonien gepickt und in jeweils 5 ml dYT mit Chloramphenicol (25 μ g/ml) und 0,3 mM IPTG transferiert. Zusätzlich wurde der Stamm FHKs ohne Plasmid als Kontrolle in dYT mit Ampicillin angezogen. Die Röhrcchen wurden für 10 – 12 h bei 30°C (150 Upm, 45° Neigung) geschwenkt.

Die benötigte Menge Z-Puffer wurde mit 50 mM β -Mercaptoethanol versetzt. Im Anschluss wurde eine Hälfte des Puffers mit 1/10 Vol Chloroform und die andere Hälfte mit 0,4 % SDS vermischt. Der Chloroform-haltige Puffer wurde bis zur Phasentrennung stehen gelassen und erst danach verwendet. Jeweils 15 μ l der \bar{u} N-Kulturen wurden in eine Mikrotiterplatte mit rundem Boden pipettiert (s. Beispielschema) und je 100 μ l Chloroform-gesättigter Z-Puffer zugegeben. Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

Tab. 28: Beispielschema zur Beladung der Mikrotiterplatte für die Detektion der β -Galaktosidaseaktivität im ToxR-Assay

Med 1-5: Medium-Kontrolle; FHK 1-5: FHKs mock-Kultur (FHKs ohne Plasmid); Mal 1-5: pHKToxR'MalE; GCN 1-5: pHKToxR'MalEGCN; S 1-5: pHKToxR'SurA; P#1-#7 1-5: pHKToxR-Fusionsproteine, die getestet werden sollen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Med1	FHK1	Mal1	GCN1	S1	P1.1	P2.1	P3.1	P4.1	P5.1	P6.1	P7.1
B	Med2	FHK2	Mal2	GCN2	S2	P1.2	P2.2	P3.2	P4.2	P5.2	P6.2	P7.2
C	Med3	FHK3	Mal3	GCN3	S3	P1.3	P2.3	P3.3	P4.3	P5.3	P6.3	P7.3
D	Med4	FHK4	Mal4	GCN4	S4	P1.4	P2.4	P3.4	P4.4	P5.4	P6.4	P7.4
E	Med5	FHK5	Mal5	GCN5	S5	P1.5	P2.5	P3.5	P4.5	P5.5	P6.5	P7.5

Die Messung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität im Zellextrakt wurde mit einem Tecan Plattenreader durchgeführt. Zu erst wurde die optische Dichte der Kulturen bestimmt. Hierfür wurde die Platte im Reader kurz geschüttelt und dann die OD₆₀₀ gemessen. Zur Lyse der Zellen wurde danach in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 50 μ l SDS-haltiger Z-Puffer zugegeben und 10 min bei 28°C inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 50 μ l oNPG-Lösung wurde bei 28°C über einen Zeitraum von 30 min alle 30 sek die optische Dichte bei 420 nm gemessen. Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde aus der maximalen Geschwindigkeit der Reaktionskurven (V_{\max}) und der optischen Dichte mit folgender Formel berechnet [Miller, 1972]:

$$Millerunits = 1000 \times \frac{V_{\max}}{OD_{600}}$$

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Interaktion von Peptiden mit MTSSL-markierten SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteinen durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

4.1.1 Auswahl von Aminosäuren im SurA-Protein zur positionsspezifischen Markierung mit der Radikalsonde MTSSL

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe sind Befunde zur Substratspezifität von SurA erhalten worden, die zeigen, dass spezifische Muster aromatischer Aminosäuren und die Orientierung ihrer Seitenketten zur selektiven Erkennung von Peptiden durch SurA beitragen [Hennecke, 2006]. Ebenso ist nachgewiesen worden, dass das Chaperon-Modul, bestehend aus N- und C-Terminus, ausreichend ist, um eine *surA*-Mutante zu komplementieren [Behrens *et al.*, 2001]. Basierend auf den Daten aus der Kristallstruktur von SurA ist zunächst angenommen worden, dass sich eine potentielle Substratbindestelle in einer zwischen dem N- und dem C-terminalen Bereich lokalisierten Spalte befindet ([Bitto and McKay, 2002, 2003], Abb. 4b). Diese wäre groß genug, um ein Peptid binden zu können. In einer späteren Arbeit ist SurA ohne die Parvulin-Domäne II in Anwesenheit eines artifiziellen SurA-bindenden Peptides kristallisiert und eine Bindestelle für das Peptid in der PPIase aktiven Parvulin-Domäne I von SurA identifiziert worden ([Xu *et al.*, 2007], Abb. 4e-g). Basierend auf diesen strukturellen Daten wurden Peptide als mögliche Interaktionspartner ausgewählt, um diese in der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie, auch Elektronenparamagnetischeresonanz (EPR)-Spektroskopie genannt) zu untersuchen. Diese Methodik ist in der Arbeitsgruppe etabliert und wurde in Kooperation mit Dr. Derek Marsh und Brigitta Angerstein am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt.

Basierend auf den Daten, die in der Arbeitsgruppe vorgelegen haben ([Hennecke, 2006], und unveröffentlichte Daten) und den Erkenntnissen aus den Kristallstrukturen von SurA [Bitto and McKay, 2002; Xu *et al.*, 2007], ist die Analyse des SurA-Proteins zur Identifikation von Substratbindestellen fortgesetzt und erweitert worden. Mittels des artifiziellen Peptides PepC ist eine Peptidbindestelle in der Parvulin-Domäne I von SurA (SurAI) identifiziert worden [Xu *et al.*, 2007]. Da auch die um beide Parvulin-Domänen deletierte Chaperondomäne von SurA die Phänotypen einer *surA*-Mutante vollständig komplementieren kann [Behrens *et al.*, 2001], ist postuliert worden, dass SurAI für die Substratelektion relevant ist [Xu *et al.*, 2007]. Da es sich bei PepC um ein artifizielles Peptid handelt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob von natürlichen Substraten abgeleitete Peptide in ähnlicher Weise an SurA binden und ob ggf. noch alternative Bindestellen identifiziert werden können.

Für die Anwendung der ESR-Spektroskopie ist es notwendig, Cystein-Reste ortsspezifisch auf der Oberfläche des zu untersuchenden Wunschproteins einzuführen und mit einer Radikalsonde zu markieren [Pfeiffer *et al.*, 1999]. Für diese auch *site directed spin labeling* (SDSL) genannte Methode sind besonders Proteine mit Primärsequenzen ohne Cystein geeignet [Millhauser *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 1999; Columbus and Hubbell, 2002], zu denen auch SurA gehört.

ERGEBNISSE

Die verwendete Radikalsonde (1-oxyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrroline-methyl) Methanthiosulfonat (MTSSL) [Stone *et al.*, 1965; Berliner *et al.*, 1982] bindet sich über eine Thiol-Kopplung kovalent an den Cystein-Rest [Kirby *et al.*, 2004]. Die so entstehende Seitenkette hat keinen wesentlichen Einfluss auf die biologische Aktivität, Stabilität und Sekundärstruktur bisher untersuchter Proteine gehabt, sofern nicht eine für die Struktur oder Funktion essentielle Aminosäure entfernt worden ist [McHaourab *et al.*, 1996; Bolin *et al.*, 1998]. MTSSL besitzt ein freies Radikal am Stickstoff-Atom. Dieses kann durch Bestrahlung mit Mikrowellen und einem angelegten Magnetfeld (3195 – 3295 Gauß) in der ESR-Spektroskopie mittels eines Spektrums des charakteristischen Resonanzsignals sichtbar gemacht werden (für eine detaillierte Beschreibung der Methode siehe 3.5.1). Die Radikalsonde dient in der ESR-Spektroskopie als Hilfsmittel zur Untersuchung der Umgebung der Sonde [Owenius *et al.*, 1999]. Über die Mobilität der Nitroxid-Seitenkette können ortstypische Informationen über Interaktionen oder Konformationsänderungen erhalten werden. Hierbei ist die Änderung des Immobilisierungsgrades der Radikalsonde entscheidend. Binden z.B. Peptide in räumlicher Nähe zu MTSSL, so ist eine verstärkte Immobilisierung der Sonde zu erwarten [Steinhoff, 2004]. Diese direkte Änderung der Sondenmobilität resultiert in einer Verbreiterung der *peaks* des Resonanzsignals. Indirekte Einflüsse auf die Mobilität der Sonde, z.B. durch eine Peptid-Bindung hervorgerufene Konformationsänderungen, können ebenfalls zu einem veränderten Spektrum führen [Wegener *et al.*, 2001]. Möglich sind auch durch eine Interaktion mit einem Peptid auftretende lokale und globale strukturelle Konformationsänderungen, die in einem verringerten Immobilisierungsgrad resultieren [Svensson *et al.*, 1995; Hubbell *et al.*, 1998; Hubbell *et al.*, 2000]. Die detaillierte Auswertung der Spektren, die häufig nur kleine, schwer detektierbare Veränderungen aufweisen, ist gemeinsam mit Dr. Derek Marsh (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen), einem ausgewiesenen Experten auf dem Gebiet der ESR-Spektroskopie [Marsh *et al.*, 2005; Marsh, 2010], vorgenommen worden.

4.1.1.1 Auswahl der mit MTSSL zu markierenden Positionen im SurA-Gesamtprotein

Zu Beginn der Arbeiten haben erste ESR-spektroskopische Daten für die Positionen H68C, Q78C, Q106C, Q223C und N227C in SurA vorgelegen ([Hennecke, 2006] und unveröffentlichte Daten). Bei allen, außer Q223C, ist eine Bindung der Radikalsonde MTSSL erfolgreich gewesen. Es ist vermutet worden, dass die Position Q223C zu verborgen im Protein liegt und daher für MTSSL nicht zugänglich ist. Für die in den Positionen Q78C, Q106C und N227C mit MTSSL markierten SurA-Proteine sind bei Bindung des Peptides Pep46, für das eine spezifische Interaktion mit SurA bereits nachgewiesen worden war, keine Änderungen des ESR-Spektrums beobachtet worden. Allerdings konnten zu geringe Proteinkonzentrationen, die in einem zu geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnis resultieren, und eine von vornherein zu starke Immobilisierung der Radikalsonde MTSSL als mögliche Ursachen nicht ausgeschlossen werden [Hennecke, 2006].

Da die Positionen Q223 und N227 sehr nah an der von Xu *et al.* (2007) postulierten Bindestelle in der Parvulin-Domäne I von SurA liegen (Abb. 10 & 11), sollten diese beiden Positionen daher noch einmal im Kontext des SurA-Gesamtproteins bei Einsatz höherer Proteinkonzentrationen untersucht werden.

ERGEBNISSE

Bei den in der Arbeitsgruppe bereits durchgeführten Arbeiten ist der Verdacht aufgekommen, dass es sich bei dem verwendeten Peptid Pep46 um ein His-*tag* bindendes Peptid handeln könnte. Bei der Analyse der Position H68 im SurA-Gesamtprotein sind teilweise Signalveränderungen in der ESR-Spektroskopie erhalten worden, aber teilweise auch nicht (persönliche Kommunikation S. Behrens-Kneip). Das Screening der Peptid-Bibliotheken ist mit einem SurA-Protein mit einem C-terminalen His-*tag* durchgeführt worden [Hennecke, 2006]. Da sich die Position H68 an der Unterseite des Proteins in räumlicher Nähe des His-*tags* befindet (Abb. 10), wurde eine mögliche Interaktion des Peptides Pep46 mit dem His-*tag* angenommen. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, sollte die Position H68 mittels der ESR-Spektroskopie sowohl in SurA-Protein mit His-*tag*, als auch His-*tag* freiem SurA analysiert werden.

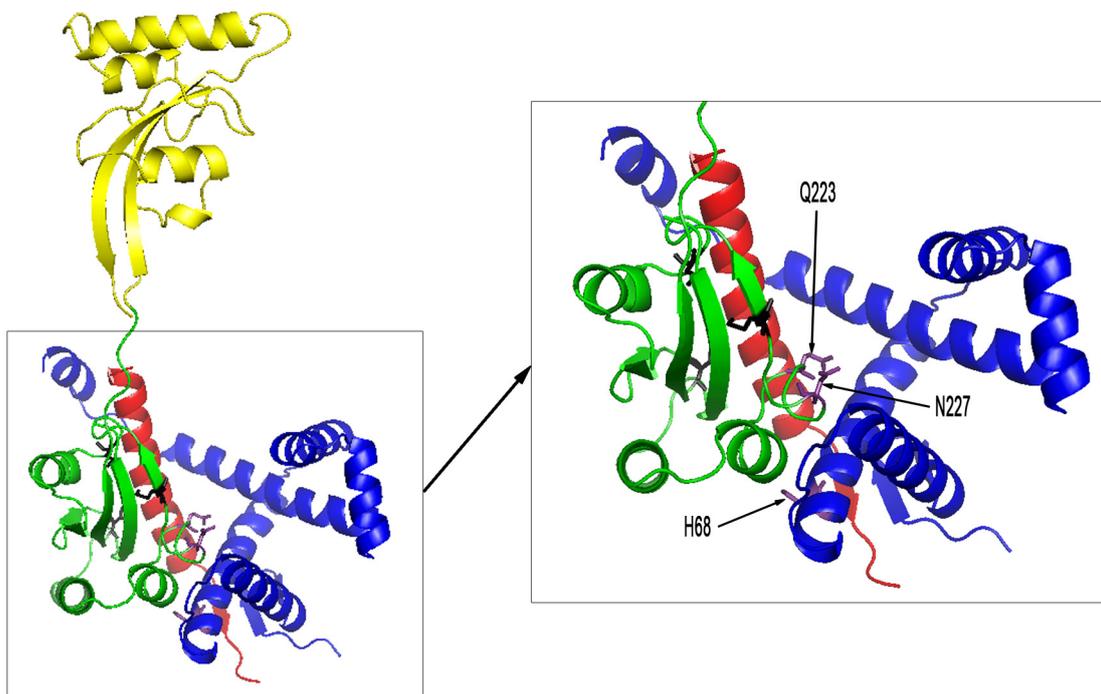


Abb. 10: Position der zur Analyse mittels ESR-Spektroskopie ausgewählten Reste in SurA. Die postulierte Peptidbindestelle liegt in der in grün dargestellten Parvulin-Domäne I von SurA ([Xu *et al.*, 2007], modifizierte Abbildung von PDB ID: 1M5Y). In schwarz markiert sind die für die Bindung relevanten Aminosäuren M231, L239 und V263. Die Aminosäurereste Q223 und N227 liegen in räumlicher Nähe hierzu. Position H68 befindet sich in der näheren Umgebung des C-Terminus von SurA, an dem sich in den rekombinant produzierten Varianten der His-*tag* befindet (der His-*tag* ist in der Abbildung nicht dargestellt). Die Aminosäurereste von Q223, N227 und H68 wurden einzeln gegen Cystein ausgetauscht, mit der Radikalsonde MTSSL markiert und die Interaktion mit Peptiden in der ESR-Spektroskopie untersucht (4.1.3.2). N-Terminus: blau, Parvulin-Domäne I: grün, Parvulin-Domäne II: gelb, C-Terminus: rot.

4.1.1.2 Auswahl der mit MTSSL zu markierenden Positionen in Parvulin-Domäne I von SurA

Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass die Markierung des SurA-Gesamtproteins mit der Radikalsonde MTSSL in einigen Positionen nur bedingt oder gar nicht möglich ist. In einigen Fällen hat die an das Protein gekoppelte Radikalsonde zudem bereits eine so hohe Grund-Immobilität gezeigt, dass Änderungen des Spektrums nicht mehr detektierbar gewesen sind [Hennecke, 2006]. Dies war vor Allem für die Positionen nahe der postulierten Peptid-Bindestelle in Parvulin-Domäne I der Fall. Hierbei war die

Position Q223 derart in der Struktur verborgen, dass die Markierung des dort integrierten Cysteins mit MTSSL nicht möglich gewesen ist [Hennecke, 2006]. Aus diesem Grund sollte die Analyse dieser Position nun mit der isolierten Parvulin-Domäne I von SurA wiederholt werden.

Basierend auf den verfügbaren Kristallstruktur-Daten von SurA [Bitto and McKay, 2002; Xu *et al.*, 2007] wurden Aminosäure-Reste zum Austausch gegen Cystein ausgewählt, die einerseits möglichst exponiert vorliegen und sich andererseits nahe der postulierten Bindestelle in der Parvulin-Domäne I befinden. Je freier und unbeeinflusster von der Umgebung die Radikalsonde MTSSL vorliegt, desto sensibler reagiert sie auf eine Interaktion mit Molekülen. Mit dem Programm *Insight II* wurde die voraussichtliche Beweglichkeit der Sonde durch den virtuellen Austausch der Reste gegen Cystein und die Markierung mit MTSSL überprüft (*data not shown*) und die Positionen Q191, D211, Q223, M231, E238 und V263 für die weitere Analyse ausgewählt (Abb. 11a).

Die Positionen Q191 und D211 sollten hierbei als Negativkontrollen dienen, da sie in der Domäne I eher auf der der postulierten Peptidbindestelle abgewandten Seite liegen (Abb. 11a) und ihre Beteiligung an der Peptidbindung als eher unwahrscheinlich angenommen worden ist.

Der Aminosäurerest Q223 liegt ebenfalls nicht unmittelbar im Bereich der postulierten Peptidbindestelle und ist daher vermutlich nicht direkt an der Substratbindung beteiligt. Er wurde ausgewählt, da er möglicherweise indirekt Auskunft über eine Peptidbindung und eine dadurch induzierte Dimerisierung der Parvulin-Domäne I geben könnte.

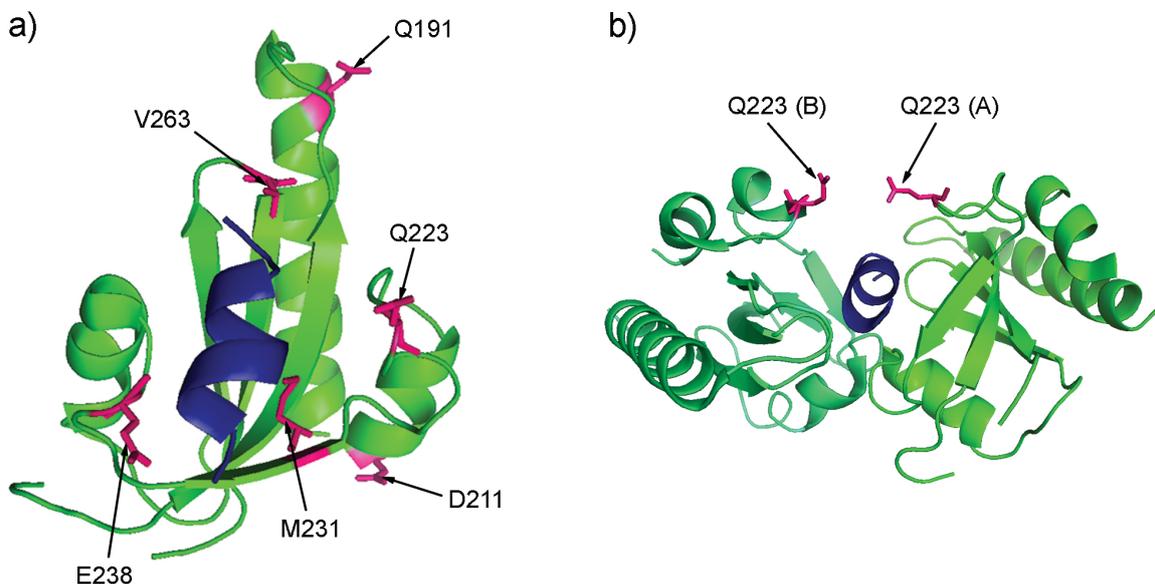


Abb. 11: Position der für die ESR-spektroskopische Analyse ausgewählten Reste in der Parvulin-Domäne I von SurA.
a) Gezeigt wird die isolierte Parvulin-Domäne I aus dem SurA-Gesamtprotein. Die Aminosäurereste von Q191, D211, Q223, M231, E238 und V263 wurden einzeln gegen Cystein ausgetauscht, mit der Radikalsonde MTSSL markiert und die Interaktion mit Peptiden in der ESR-Spektroskopie untersucht (4.1.3). Die Aminosäurereste von M231, E238 und V263 sind direkt an der Bindung des Peptides beteiligt [Xu *et al.*, 2007]. Die Positionen Q191 und D211 liegen außerhalb der postulierten Bindestelle. **b)** Gezeigt sind die beiden isolierten Parvulin-Domänen I aus einem SurANICt-Dimer. Die Reste Q223 liegen sich im SurANICt-Dimer direkt gegenüber. Daher wäre im Falle einer Dimer-Bildung zweier isolierter in dieser Position MTSSL-markierter SurAI-Domänen die Beobachtung einer *spin-spin*-Interaktion der Radikalsonden möglich. Die gezeigten Strukturen wurden modifiziert nach ([Xu *et al.*, 2007], PDB ID: 2PV3).

In der Struktur des SurANICt-Dimers mit gebundenem Peptid PepC [Xu *et al.*, 2007] liegen sich die Aminosäurereste Q223 der beiden SurA-Untereinheiten gegenüber, sodass in dieser Position lokalisierte Radikalsonden sich unmittelbar gegenüber und somit zu einer *spin-spin*-Interaktion führen könnten (Abb. 11b). Die Aminosäurereste M231, E238 und V263 liegen in der postulierten Substratbindestelle und sind unmittelbar in die Peptidbindung involviert [Xu *et al.*, 2007].

4.1.2 Generierung der SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteine

Zum Austausch der Codons der ausgewählten Aminosäurereste wurden *Primer* definiert, die anstelle des ursprünglichen Codons ein Cystein-Codon (TGC oder TGT) enthielten. Mit Hilfe dieser *Primer* konnte auf DNA-Ebene das Cystein-Codon ortsspezifisch mittels *quick change mutagenesis* (QC)-PCR in die Vektoren pASKSurA bzw. pASKcSurAI eingeführt werden. Die mit *DpnI* verdauten PCR-Produkte wurden in chemisch kompetente DH5 α -Zellen eingebracht und die Plasmide der erhaltenen Klone präpariert. Der Austausch gegen das Cystein-Codon an der gewünschten Position wurde durch Sequenzierung bestätigt. Zur Produktion der modifizierten Proteine wurde der Expressionsstamm YM10105 mit den entsprechenden Plasmiden transformiert.

Für die Durchführung der ESR wurden die SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteine produziert, gereinigt und mit der Radikalsonde (1-oxyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrroline-methyl) Methanthiosulfat (MTSSL) markiert.

4.1.2.1 Generierung der SurA-Cys-Proteine

Die Präparation der SurA-Cys-Proteine aus dem Periplasma von *E. coli*, sowie die Reinigung und Markierung mit MTSSL erfolgte laut dem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll. Da alle SurA-Cys-Proteine in einem gewissen Ausmaß durch Disulfidbrückenbildung dimerisierten, wurden die Proteine nach Bindung an die Nickel-Säule im immobilisierten Zustand durch Zugabe von 1 mM DTT reduziert. Nach einem Waschschrift wurden die SurA-Cys-Proteine direkt auf der Säule mit der Radikalsonde MTSSL markiert und im Anschluss stufenweise eluiert. Zur Entfernung von freier Radikalsonden, Dimeren und Verunreinigungen wurden die MTSSL-markierten SurA-Cys-Proteine über Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt. Mit diesem Schritt konnten unmarkierte Proteindimere zwar nicht vollständig aus der Proteinlösung entfernt, ihr Anteil aber deutlich reduziert werden. Die Variante SurA_H68C-Thrombin-His wurde zusätzlich einer Thrombinspaltung unterzogen, um den C-terminalen His-tag zu entfernen. Der Erfolg der Reduktion und Reinigung der Proteine sowie der Separierung ihrer dimeren und monomeren Formen wurde routinemäßig mittels SDS-PAGE überprüft. Exemplarisch ist dies in Abb. 12 am Beispiel von SurAI_Q191C dargestellt. Die so vorbereiteten Proteine wurden für die Messung der ESR-Spektren eingesetzt.

In bisherigen Studien wurde kein wesentlicher Einfluss der durch die Bindung der Radikalsonde an das Cystein entstehenden Seitenkette auf die biologische Aktivität oder auf die Sekundärstruktur der untersuchten Proteine beobachtet, sofern nicht eine für die Struktur oder Funktion essentielle Aminosäure substituiert wurde [McHaourab *et al.*, 1996; Bolin *et al.*, 1998].

ERGEBNISSE

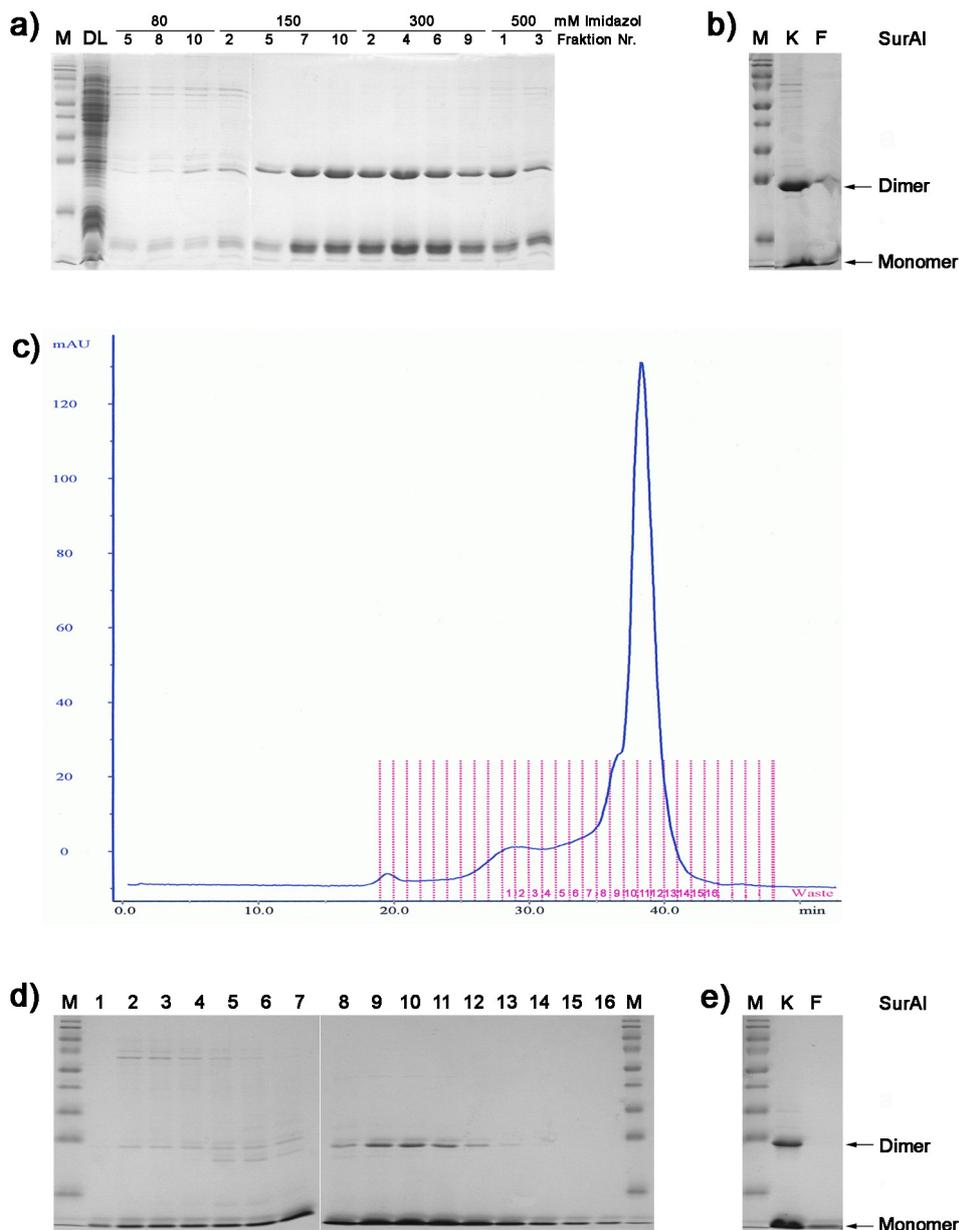


Abb. 12: Reinigung der SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteine am Beispiel von SurAI_Q191C. Die SurA-Cys- und die SurAI-Cys-Proteine wurden in einem zweistufigen Prozess mittels IMAC und Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt und analysiert. Gezeigt ist als ein repräsentatives Beispiel die Analyse der Variante SurAI_Q191C. **a)** SDS-PAGE der eluierten Fraktionen aus der IMAC. Es wurden jeweils 15 µl der angegebenen Fraktionen der Imidazol-Stufenelution in einem 15 % igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Fraktionen, die ausschließlich das gewünschte Protein und keine Verunreinigungen mehr zeigten (hier 150.5 bis 500.4), wurden vereinigt und für die weitere Analyse eingesetzt. **b)** Analyse der MTSSL-markierten, konzentrierten SurAI_Q191C-Proteine nach der IMAC mittels SDS-PAGE. Die Proteine liegen im Konzentrat überwiegend als Dimer vor. **c)** Profil der Gelfiltrationschromatographie. Die konzentrierten Proteine wurden an einer HPLC (ÄKTA Explorer, GE Healthcare) über eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200 10/30) aufgetrennt (Flußrate 0,5 ml/min; Puffer A, pH 8,0) und fraktioniert (0,5 ml/Fraktion). **d)** 15 µl von ausgewählten Fraktionen der Gelfiltrations-Chromatographie wurden in einer 15 % igen SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die weitestgehend kein Dimer enthielten (hier 1–8 und 12–16), wurden vereinigt und einkonzentriert. Eine Trennung der monomeren von den dimeren Proteinen war nicht vollständig möglich. **e)** SDS-PAGE der gereinigten, MTSSL-markierten SurAI_Q191C-Proteine. Der Anteil an Protein-Dimeren konnte deutlich vermindert werden. Die Proteine wurden in dieser Form für die ESR-Spektroskopie eingesetzt. M = Prestained Protein Molecular Weight Marker; DL = Durchlauf; K = Konzentrat; F = Filtrat; Ziffern = Nummer der jeweiligen analysierten Fraktion

Auch eine Markierung des SurA-Proteins mit MTSSL in den Positionen H68C, Q223C und N227C hatte keinen detektierbaren Einfluss auf seine Chaperonaktivität *in vitro* [Hennecke, 2006].

4.1.2.2 Generierung der SurAI-Cys-Proteine

Die Produktion der isolierten Parvulin-Domäne I von SurA im Periplasma des *surA*-defizienten Produktionsstammes YM10105 und ihre Reinigung aus der periplasmatischen Fraktion resultierte in einer für die ESR-Spektroskopie zu geringen Proteinausbeute (*data not shown*). Möglicherweise ist dies auf die instabile Zellhülle der *surA*-Mutante [Lazar and Kolter, 1996; Rouviere and Gross, 1996] und eine dadurch eventuell geringere Kapazität für die Überproduktion eines Proteins im Periplasma zurückzuführen. Der Defekt der Zellhülle wird durch die periplasmatische Produktion von Vollängen-SurA, nicht aber durch die Produktion seiner isolierten Domäne I komplementiert [Behrens *et al.*, 2001]. Aus diesem Grund wurden die SurAI-Proteine vom Expressionsvektor pASKcSurAI im Cytoplasma des Produktionsstammes exprimiert. Die Reinigung der Proteine aus dem Cytoplasma erfolgte ebenfalls in einem mehrstufigen Verfahren und ist am Beispiel von SurAI_Q191C in Abb. 12 dargestellt.

Die SurAI-Cys-Proteine wurden aus dem Gesamtzellextrakt mittels IMAC isoliert. Dabei zeigten alle SurAI-Cys-Proteine eine hohe Tendenz zur Dimerisierung durch Ausbildung von Disulfidbrücken, die sich durch Reduktion der Proteine mit DTT im immobilisierten Zustand auf der Säule nicht effizient vermindern ließ. Daher wurden die Proteine zur Reduktion nach der Reinigung über Nacht gegen eine Pufferlösung mit 1 mM Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP), einem stärkeren, zur Reduktion von Proteinen geeigneten Mittel [Han and Han, 1994; Getz *et al.*, 1999], dialysiert. Anschließend wurden die reduzierten SurAI-Cys-Proteine zur Entfernung des Reduktionsmittels TCEP über eine Nap10-Säule (Sephadex 25, GE Healthcare) gegeben und das Eluat sofort mit der Radikalsonde MTSSL versetzt. Für die Bindungsreaktion wurde die Mischung über Nacht bei Dunkelheit auf Eis inkubiert. Zur Entfernung freier Radikalsonden, Dimeren und Verunreinigungen wurden die MTSSL-markierten SurAI-Cys-Proteine über Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt. Eine vollständige Entfernung der Dimere war nicht möglich, jedoch konnte der Anteil dimerer und damit nicht MTSSL-markierter Proteine durch die Behandlung mit TCEP deutlich reduziert werden. Die auf diese Weise vorbereiteten Proteine wurden in der ESR-Spektroskopie eingesetzt.

4.1.3 ESR-spektroskopische Untersuchung der Peptid-SurA-Interaktion

4.1.3.1 Grundlagen und Durchführung der Messungen der ESR-Spektroskopie

Die zu analysierenden MTSSL-markierten SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteine wurden in Anwesenheit von Peptiden ESR-spektroskopisch vermessen. Als Referenz-Spektrum wurde zunächst das ESR-Spektrum der freien Radikalsonde MTSSL ermittelt. MTSSL besitzt ein freies Radikal am Stickstoff-Atom (Abb. 13a), welches durch Bestrahlung mit Mikrowellen und einem angelegten Magnetfeld mittels eines Spektrums des charakteristischen Resonanzsignals sichtbar gemacht werden kann (Abb. 13b, Details zur Methode siehe Kap. 3.5.1).

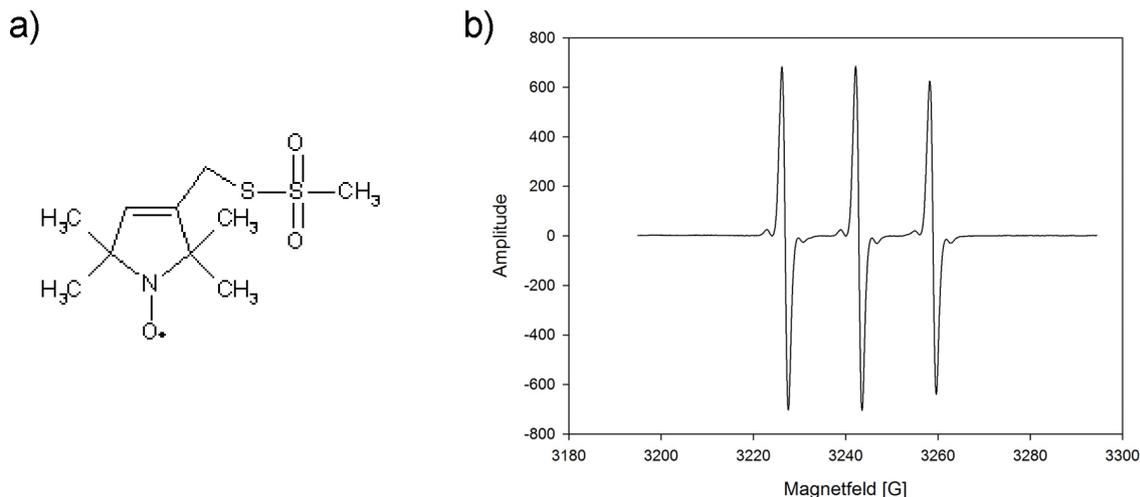


Abb. 13: Struktur und typisches ESR-Spektrum der Radikalsonde MTSSL. a) Chemische Struktur der Radikalsonde (1-oxyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrroline-methyl) Methanthiosulfonat (MTSSL) [Stone *et al.*, 1965; Berliner *et al.*, 1982]. **b)** Das freie Elektron der Nitroxid-Gruppe resultiert in einem typischen Triplett-Spektrum für ungebundenes MTSSL in Lösung (Puffer A, pH 8,0, Magnetfeld 3195 bis 3295 G).

Das ESR-Spektrum des freien MTSSL in Lösung zeigt drei für das freie Elektron charakteristische *peaks*. Durch Vergleich mit diesem Referenz-Spektrum kann Rückschlüsse auf die Mobilität der Radikalsonde MTSSL an den untersuchten Positionen in einem Protein ermöglichen.

Die ESR-spektroskopische Messung der MTSSL-markierten SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteine erfolgte an einem Varion X-Band EPR Spektrometer mit Mikrowellenstrahlung von 9,118 GHz bei 5 bis max. 20 mW bei Raumtemperatur. Es wurde in einem Bereich des angelegten magnetischen Feldes von 3195 bis 3295 Gauß (G) gemessen. Das Zentrum des Spektrums lag bei 3255 Gauß. Der Verstärkungsfaktor wurde je nach Proteinkonzentration für die jeweiligen Messreihen individuell festgelegt. Die Messungen wurden mindestens dreimal für jeweils 2 oder 4 min durchgeführt und die Werte gemittelt. Die erhaltenen Spektren der Protein/Peptid-Komplexe wurden hinsichtlich der Verbreiterung bzw. des Abflachens der Kurven im Vergleich zum Spektrum des Proteins ohne Zugabe von Peptid verglichen.

Basierend auf den Abständen zwischen dem mittleren und den äußeren *peaks* (*peak to peak*-Abstand) und dem Vergleich der *peak*-Höhe der äußeren zum mittleren *peak*, können Aussagen über die Mobilität der Radikalsonde getroffen werden [Atkins, 2006]. Aus einer Kombination aus verminderter *peak*-Höhe und vergrößertem *peak to peak*-Abstand kann auf eine verringerte Mobilität des freien Elektrons geschlossen werden [Steinhoff, 1988].

Für die Peptidbindungsstudien wurden 12 – 14 Aminosäuren lange Peptide verwendet (Tab. 29), die bei der Durchmusterung von Peptid-Bibliotheken natürlicher Substrate von SurA als starke SurA-bindende Peptide identifiziert worden waren (Pep46, Pep54, Pep95) [Hennecke, 2006]. Diese Peptide weisen in der Vorhersage eine Struktur vorwiegend als β -Faltblatt auf und verfügen zusätzlich über spezifische Muster aromatischer Aminosäuren. Das in dieser Studie als nicht SurA-bindendes identifizierte Peptid Pep71 [Hennecke, 2006] wurde in der vorliegenden Arbeit als Negativkontrolle verwendet.

ERGEBNISSE

Zudem war zu Beginn der Arbeiten die Kristallstruktur eines SurA-Peptid-Komplexes publiziert worden, der die Bindung eines Peptides an die Parvulin-Domäne I von SurA aufzeigte und damit auf eine dort lokalisierte spezifische Substratbindestelle in SurA schließen ließ [Xu *et al.*, 2007]. Das verwendete Peptid PepC war mittels *phage display* als SurA-bindendes Peptid identifiziert worden und weist eine α -helikale Struktur auf [Xu *et al.*, 2007]. Dieses Peptid wurde ebenfalls synthetisiert und als Positivkontrolle für die ESR-Untersuchungen eingesetzt. Seine Bindung an SurA-Varianten mit MTSSL-Markierung in unmittelbarer Nähe der postulierten Substratbindestelle in Domäne I sollte in einer deutlichen Änderung des ESR-Spektrums resultieren. Das Peptid PepC stand zu dem Zeitpunkt, als die Messungen mit dem SurA-Gesamtprotein durchgeführt wurden, noch nicht zur Verfügung und fand daher lediglich für die Bindungsstudien an die isolierte Domäne I von SurA Einsatz (4.1.3.3).

Tab. 29: Für die ESR-Spektroskopie verwendete Peptide.

Name Peptid	Beschreibung	Quelle	Aminosäure-Sequenz	Referenz
<u>Binder</u>				
Pep46	LamB-spezifisches Peptid	Peptid-Bibliothek	DVHMIDFYYWDISC	[Hennecke, 2006]
Pep54	OmpF-spezifisches Peptid	Peptid-Bibliothek	GVATYRNSNFFGL	[Hennecke, 2006]
Pep95	OmpF-spezifisches Peptid	Peptid-Bibliothek	LLVAQYQDFDGLR	[Hennecke, 2006]
PepC	Artifizielles Peptid	Phage Display-Bibliothek	NFTLKFWDFIRK	[Xu <i>et al.</i> , 2007]
<u>Nicht-Binder</u>				
Pep71	LamB-spezifisches Peptid	Peptid-Bibliothek	TLELGVDYGRANL	[Hennecke, 2006]

4.1.3.2 Analyse der SurA-Peptid-Interaktion mittels ESR-Spektroskopie

Zur Vorbereitung der Analyse der SurA-Peptid-Interaktion mittels ESR-Spektroskopie wurden die gereinigten mit MTSSL-markierten Proteine in Konzentrationen von 100 – 300 μ M mit einem zwei- (SurA_H68C) bzw. vierfachen (SurA_N227C und SurA_Q223C) molaren Überschuss an Peptid (Pep46 bzw. Pep71) für 2 h in Puffer A, pH 8,0 bei Raumtemperatur inkubiert. Der Einsatz geringerer Proteinkonzentrationen kann in einem zu geringen Signal-zu-Rausch Verhältnis resultieren, welches keine schlüssige Analyse der resultierenden Spektren zulässt [Hammarström *et al.*, 2001]. Für die ESR-spektroskopische Untersuchung wurde ein Magnetfeld von 3195 bis 3295 Gauß [G] angelegt, wobei das Zentrum des Spektrums bei 3255 G lag. Jede Messung wurde mindestens dreimal durchgeführt. Repräsentative Spektren sind in Abb. 14 gezeigt. Zur Veranschaulichung des Ortes der Cystein-Mutationen in Relation zum gebundenen PepC aus der Kristallstruktur [Xu *et al.*, 2007] sind den ESR-Spektren kleine Darstellungen der Struktur der SurA-Proteine beigefügt, in denen die relevante Aminosäure markiert wurde.

ERGEBNISSE

Zu Anfang sollten die vorläufigen ESR-Analysen der SurA-Peptid-Interaktion mit den Varianten SurA_H68C, SurA_Q223C und SurA_N227C abgeschlossen werden. Hierfür galt es zunächst zu überprüfen, ob es sich bei Peptid Pep46 aus der LamB-Bibliothek tatsächlich um ein His-*tag* bindendes Peptid handelt (persönliche Kommunikation Dr. habil. S. Behrens-Kneip und Details siehe 4.1.1). Die Bindung von Pep46 an das in Position H68C mit MTSSL markierte SurA-Protein hatte in ersten ESR-spektroskopischen Analysen zu einer deutlichen Änderung des Spektrums geführt [Hennecke, 2006]. Dies hätte aufgrund der räumlichen Nähe der Position H68C im SurA-Protein zum C-terminalen His-*tag* auch durch eine Bindung des Peptides an den His-*tag* verursacht werden können. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurde durch Thrombinspaltung ein His-*tag* freies SurA-H68C-Protein generiert und die Interaktion der MTSSL-markierten Proteine SurA_H68C-MTSSL mit und ohne His-*tag* mit den Peptiden Pep46 bzw. Pep71 vergleichend ESR-spektroskopisch untersucht (Abb. 14a & b).

Die ESR-Spektren der MTSSL-markierten SurA_H68C-Proteine mit und ohne C-terminalen His-*tag* sind identisch. Im Vergleich zum Spektrum der freien Radikalsonde (Abb. 13b) sind die Spektren etwas breiter und die äußeren *peaks* flacher, welches auf eine reduzierte Beweglichkeit der Sonde hinweist [Hoppe, 1982; Hammarström *et al.*, 2001; Steinhoff, 2004]. Lediglich der mittlere *peak* weist noch eine Ähnlichkeit zum Spektrum des freien Radikals auf. Die Anwesenheit der Peptide Pep46 und Pep71 resultierte bei keinem der beiden Proteine in einer signifikanten Änderung des Spektrums der Radikalsonde (Abb. 14a & b). Damit konnten die zuvor für das SurA_H68C-Protein mit C-terminalem His-*tag* beobachteten Daten nicht bestätigt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das Peptid Pep46 nicht in räumlicher Nähe zur Position H68 an SurA und mit großer Wahrscheinlichkeit auch nicht an den C-terminalen His-*tag* von SurA bindet.

Für das Protein SurA_Q223C-MTSSL konnte lediglich unspezifisches Rauschen, jedoch kein ESR-Spektrum der Radikalsonde erhalten werden (Abb. 14.c). Dies stimmt mit bisherigen Daten überein, und deutet darauf hin, dass sich diese Position nicht mit MTSSL markieren lässt, da sie im SurA-Gesamtprotein zu sehr in der Struktur verborgen liegt [Hennecke, 2006]. Aufgrund der Nähe dieser Position zu der postulierten Substratbindestelle in Parvulin-Domäne I, wurde die Q223C-Mutation für nachfolgende ESR-Analysen in die isolierte Domäne I von SurA eingeführt, um gegebenenfalls die durch die Peptidbindung induzierte Dimerisierung nachweisen zu können (siehe auch 4.1.1.2).

In vorangegangenen Analysen konnte für SurA_N227C aufgrund eines zu geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses kein signifikanter Effekt auf die Mobilität der Radikalsonde MTSSL erhalten werden (Dr. G. Hennecke, unveröffentlichte Daten). Da sich auch diese Position in räumlicher Nähe zu der veröffentlichten Substratbindestelle in Domäne I befindet, wurde diese Variante bei höherer Proteinkonzentration erneut untersucht. Das erhaltene MTSSL-spezifische ESR-Spektrum zeigt, dass diese Position für eine Markierung zugänglich ist (Abb. 14d). Das ESR-Spektrum ohne Peptid weist im Vergleich zum freien MTSSL eine Verbreiterung und ein starkes Abflachen der äußeren *peaks*, in wesentlich stärkerem Ausmaß als es bei SurA_H68C der Fall ist, auf. Dies spricht für einen relativ hohen Immobilisierungsgrad der Radikalsonde [Hoppe, 1982; Hammarström *et al.*, 2001; Steinhoff, 2004], bedingt durch die Nähe zu den umgebenden Aminosäureresten in der Proteinstruktur. Dennoch ist in

ERGEBNISSE

Anwesenheit von Pep46 eine leichte Verbreiterung des Spektrums durch eine Verschiebung des linken äußeren *peaks* zu erkennen. Dies spricht für eine weitere Verringerung der Mobilität der Radikalsonde, die durch eine Bindung des Peptides in der Umgebung der Sonde zu erklären ist. In Anwesenheit der Peptide Pep71 (Abb. 14d, blaue Linie), sowie Pep54 und Pep95 (*data not shown*) war keine Änderung der Spektren zu erkennen.

Die ESR-Analyse des in Position E238C mit MTSSL markierten SurA-Proteins ließ auf einen bereits hohen Immobilisierungsgrad der Sonde schließen. In Anwesenheit der Peptide war keine weitere Veränderung der Spektren erkennbar (*data not shown*). Da diese Position im Bereich der postulierten Peptidbindestelle in Domäne I von SurA liegt, wurde diese Mutation auch in SurAI untersucht.

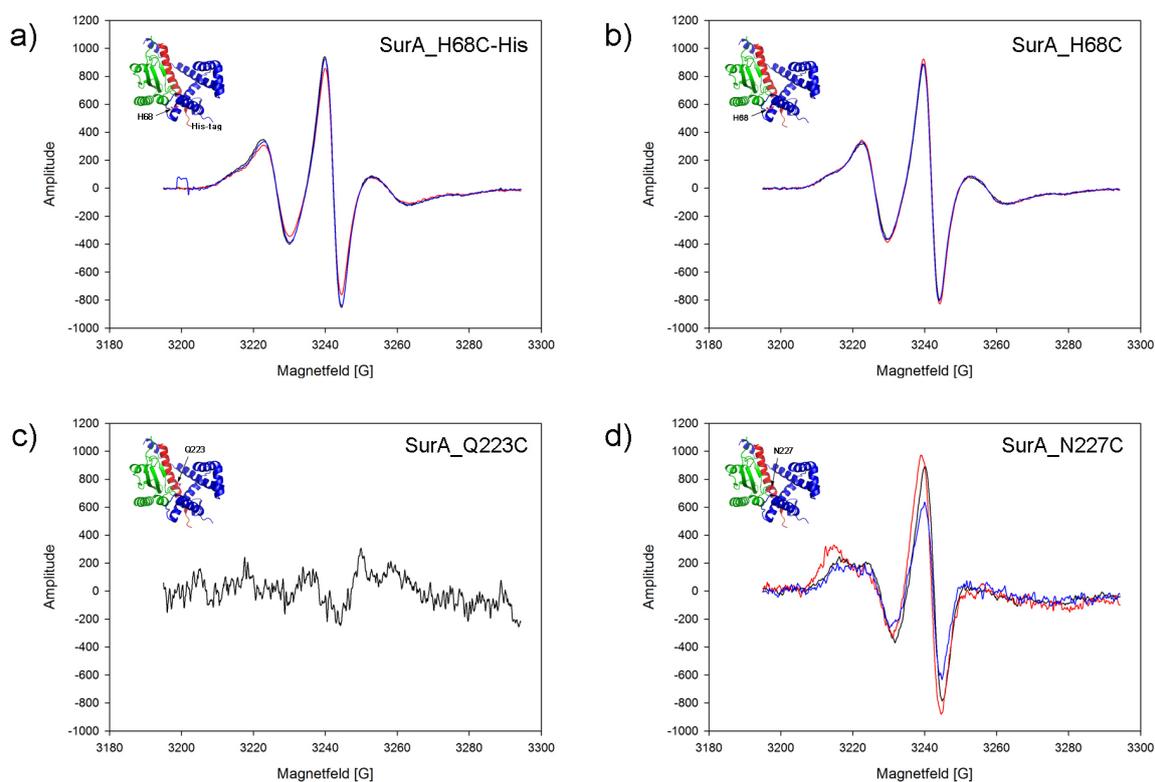


Abb. 14: Untersuchung des Einflusses von Peptiden auf die Mobilität der Radikalsonde MTSSL in unterschiedlichen SurA-Cys-Mutanten. Gezeigt sind die ESR-Spektren des freien Elektrons der Radikalsonde MTSSL, mit der verschiedene SurA-Cys-Mutanten ortsspezifisch markiert wurden. Untersucht wurden die SurA-Cys-Mutanten (a) SurA_H68C mit C-terminalem His-tag, (b) SurA_H68C ohne C-terminalen His-tag, (c) SurA_Q223C und (d) SurA_N227C. Die SurA-Cys-Mutanten wurden für 1 h in Gegenwart von 1 mM MTSSL in Puffer A, pH 6,7 bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend laut Protokoll gereinigt. Die mit MTSSL-markierten Proteine wurden mit einem zwei- (a & b) bzw. vierfachen (c & d) molaren Überschuss an Peptid für 2 h in Puffer A, pH 8,0 bei Raumtemperatur inkubiert. Für die ESR-spektroskopische Untersuchung wurde ein Magnetfeld von 3195 bis 3295 Gauß [G] angelegt, wobei das Zentrum des Spektrums bei 3255 G lag. Jede Messung wurde mindestens dreimal durchgeführt und es werden repräsentative Spektren gezeigt (ohne Peptid = schwarz; mit Pep46 = rot; mit Pep71 = blau). (a & b) Die Spektren der Variante SurA_H68C-MTSSL weisen mit und ohne His-tag sowie in Anwesenheit der Peptide einen vergleichbaren Verlauf auf. Eine Bindung des Peptides Pep46 in der näheren Umgebung der Sonde in Position H68 von SurA oder an den C-terminalen His-tag konnte damit nicht bestätigt werden. (c) Für SurA_Q223C-MTSSL konnte auch bei höherer Proteinkonzentration und maximaler Verstärkung kein ESR-Signal erhalten werden, was übereinstimmend mit früheren Daten dafür spricht, dass diese Position im SurA-Gesamtprotein nicht mit MTSSL markierbar ist. (d) Das Spektrum des Proteins SurA_N227C-MTSSL ist in Anwesenheit von Pep46 etwas verbreitert. Dies spricht für eine leicht verstärkte Immobilisierung der Radikalsonde MTSSL durch eine Peptidbindung in der näheren Umgebung.

4.1.3.3 Analyse der Interaktion der isolierten Parvulin-Domäne I von SurA mittels ESR-Spektroskopie

Einige der Aminosäurereste im Bereich der postulierten Peptidbindestelle der Parvulin-Domäne I von SurA liegen im Gesamtprotein relativ verborgen vor, so dass eine ESR-Untersuchung dieser Positionen in der isolierten Parvulin-Domäne I von SurA durchgeführt wurde.

Die SurAI-Cys-Mutanten wurden für die ESR-Spektroskopie laut Protokoll mit MTSSL markiert und gereinigt. Die auf diese Weise vorbereiteten Proteine wurden mit einem dreifachen Überschuss an Peptid (Erläuterungen und Sequenz: Tab. 29) für 2 h in Puffer A, pH 8,0 bei Raumtemperatur inkubiert. Die MTSSL-markierten SurAI-Cys-Proteine wurden in Konzentrationen von 400 – 700 μM eingesetzt. Es wurden diese relativ hohen Proteinkonzentrationen eingesetzt, um ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten, obwohl ein Teil der Proteine als Dimer und damit ohne MTSSL-Markierung vorlag [Hammarström *et al.*, 2001].

Bei der Durchführung der ESR-Spektroskopie wurde ein Magnetfeld von 3195 bis 3295 Gauß (G) mit einem Zentrum von 3255 G angelegt. Jede Messung wurde mindestens dreimal durchgeführt und repräsentative Spektren sind in Abb. 15 gezeigt.

Anhand der Struktur wurden Positionen für die Markierung mit MTSSL ausgewählt, die einerseits möglichst frei und zugänglich vorliegen und sich andererseits in der näheren Umgebung der postulierten Bindestelle in SurAI befinden. Basierend auf dieser Grundlage wurden die Positionen Q191, D211, Q223, M231, E238 und V263 für die Substitution mit Cystein und die weitere Analyse ausgewählt. Die Lokalisation der ausgewählten Positionen innerhalb der isolierten Parvulin-Domäne I von SurA ist in einer kleinen Darstellung bei den ESR-Spektren in Abb. 15 gezeigt. Die Anwesenheit der Peptide Pep54 und Pep95 führte bei keiner der Messungen zu einer signifikanten Änderung des Spektrums. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Daten für diese Peptide nicht dargestellt (*data not shown*).

Die Positionen Q191 und D211 liegen von der postulierten Bindestelle wegweisend an der Rückseite von SurAI und sind laut Strukturdaten nicht direkt an der Peptidbindung beteiligt. Sie wurden daher als Negativkontrolle herangezogen. Hier bleibt allerdings zu berücksichtigen, dass auch strukturelle Änderungen innerhalb des Proteins Einfluss auf das ESR-Spektrum der Radikalsonde haben können [Svensson *et al.*, 1995; Hubbell *et al.*, 1998; Hubbell *et al.*, 2000].

Die Bindung von PepC an SurAI_Q191C-MTSSL führte laut ESR-Spektroskopie zu einer leichten Immobilisierung der Radikalsonde (Abb. 15a). Dies äußerte sich in einer Verbreiterung des ESR-Spektrums und einer verminderten *peak*-Höhe. Dieser Aminosäurerest ist laut Struktur der Peptid-Bindungsstelle [Xu *et al.*, 2007] allerdings nicht direkt an der Bindung beteiligt, sondern ist in einiger Entfernung zur Bindungsstelle lokalisiert. Möglicherweise ist die Änderung des Spektrums in Anwesenheit von PepC daher auf strukturelle Veränderungen im Protein bei Bindung des Peptides an die entferntere Bindestelle zurückzuführen. Für keines der anderen getesteten Peptide konnte ein Einfluss auf die Mobilität der Sonde in dieser Position beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von SurAI_D211C-MTSSL (Abb. 15b). Bei dieser Variante wurde in Anwesenheit von PepC keine Änderung des Spektrums beobachtet. In Anwesenheit der Peptide Pep46, Pep54, Pep95 und in geringem Ausmaß auch in Anwesenheit des nicht-bindenden Peptides Pep71

ERGEBNISSE

hingegen, wurde der rechte *peak* des Spektrums wesentlich steiler, entsprechend einer höheren Mobilität von MTSSL. Diese Änderungen der Spektren wären durch konformationelle Änderungen des Proteins infolge der Peptidbindung an einer von Position D211 entfernten Stelle in SurA zu erklären. Die Tatsache, dass dieser Effekt jedoch nicht für PepC zu beobachten war, deutet darauf hin, dass diese Bindestelle nicht mit der postulierten Bindestelle von PepC identisch ist. Da jedoch auch die Anwesenheit von Pep71, das als ein nicht an SurA bindendes Peptid identifiziert wurde [Hennecke, 2006], zu einem ähnlichen, wenn auch schwächer ausgeprägten Effekt führte, ist eine unspezifische Interaktion der Peptide mit der isolierten Domäne I von SurA nicht auszuschließen.

Die Aminosäurereste Q223, M231, E238 und V263 liegen in bzw. in der Nähe der von [Xu *et al.*, 2007] veröffentlichten Peptidbindestelle in der Parvulin-Domäne I von SurA und wurden daher für die Analyse mittels ESR-Spektroskopie ausgewählt.

In der Kristallstruktur des SurANICt-Dimers mit gebundenem PepC liegen sich die Aminosäurereste Q223 der beiden Untereinheiten von SurAI direkt gegenüber (Abb. 11b). So wurde angenommen, dass es, auch wenn diese Position vermutlich nicht unmittelbar an der Peptidbindung beteiligt ist, durch die Dimerisierung zu einer *spin-spin*-Interaktion der Radikalsonden kommen könnte. Im Falle einer Dimerisierung würden die beiden MTSSL-markierten Positionen Q223 sich eventuell gegenüber und somit in Reichweite einer spezifischen *spin-spin*-Interaktion liegen. Somit könnte hiermit ein Nachweis in der ESR-Spektroskopie für die Dimerisierung der SurAI-Proteine erbracht werden. Innerhalb des Gesamtproteins von SurA war eine MTSSL-Markierung von Q223 nicht möglich, da diese Position zu sehr in der Struktur verborgen liegt (4.1.3.2). Im Gegensatz dazu liegt der Aminosäurerest Q223 in der isolierten Domäne I von SurA relativ exponiert vor.

Die ESR-Analyse des SurAI_Q223C-MTSSL-Proteins ließ jedoch keine durch die Anwesenheit von PepC induzierte *spin-spin*-Interaktion erkennen (Abb. 15c, persönliche Kommunikation Dr. D. Marsh). Damit eine Interaktion von zwei Sonden detektiert werden kann, müssen diese relativ nah beieinander liegen. Dies wäre der Fall, wenn die Peptidbindung und die Dimerisierung der beteiligten Proteine so wie in der Kristallstruktur des SurANICt-Peptid-Komplexes von [Xu *et al.*, 2007] stattfinden würde. Allerdings wurde diese Dimerisierung auch nur für eines, der von diesen Autoren getesteten Peptide (PepC) beobachtet. Bei dem zweiten, kürzeren Peptid (PepN) lag das Protein mit gebundenem Peptid als Monomer vor. Da in den hier durchgeführten Versuchen nicht die von [Xu *et al.*, 2007] verwendete SurA-Variante SurANICt, sondern die isolierte PPIase Domäne I von SurA getestet wurde, ist auch ein anderes Bindungsverhalten der Proteine nicht auszuschließen.

Dennoch liefern die ESR-Analysen Hinweise auf eine Interaktion der Peptide PepC und Pep46 mit SurAI in der Nähe der Position Q223 (Abb. 15c). Für die Peptide Pep46 und etwas stärker für PepC wurde eine Abflachung der *peaks* und ein leicht verminderter *peak-to-peak* Abstand beobachtet. Diese Abflachung resultiert in einer *peak*-Verbreiterung, die für eine Immobilisierung der Sonde in Gegenwart der Peptide Pep46 und PepC stehen. Dies ist als ein direkter, wenn auch sehr schwacher Effekt auf die Mobilität der Radikalsonde zu werten, der im Einklang mit den Strukturdaten [Xu *et al.*, 2007] für die Bindung der Peptide in näherer, wenn auch nicht unmittelbarer Umgebung spricht.

ERGEBNISSE

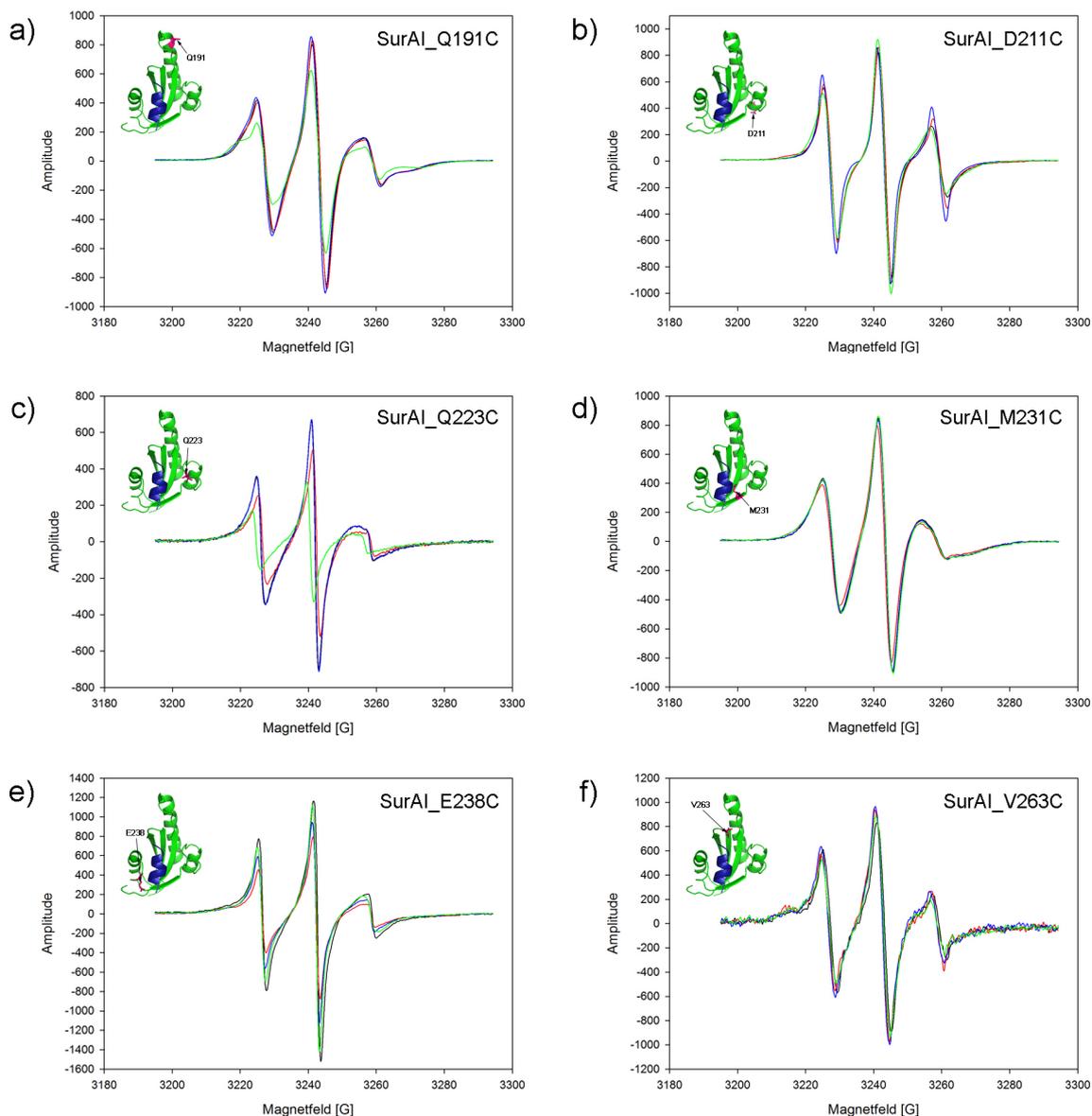


Abb. 15: Untersuchung des Einflusses von Peptiden auf die Mobilität der Radikalsonde MTSSL in SurAI-Cys-Mutanten.

Gezeigt sind die ESR-Spektren des freien Elektrons der Radikalsonde MTSSL, mit der verschiedene SurAI-Cys-Mutanten ortsspezifisch markiert wurden. Untersucht wurden die SurAI-Cys-Mutanten **(a)** SurAI_Q191C, **(b)** SurAI_D211C, **(c)** SurAI_Q223C, **(d)** SurAI_M231C, **(e)** SurAI_E238C und **(f)** SurAI_V263C. Die Proteine wurden laut Protokoll gereinigt und in Gegenwart von 1 mM MTSSL in Puffer A, pH 6,7 über Nacht auf Eis inkubiert. Die mit MTSSL markierten Proteine wurden mit einem dreifachen molaren Überschuss an Peptid für 2 h in Puffer A, pH 8,0 bei Raumtemperatur inkubiert. Für die ESR-spektroskopische Untersuchung wurde ein Magnetfeld von 3195 bis 3295 Gauß [G] angelegt, wobei das Zentrum des Spektrums bei 3255 G lag. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt und es werden repräsentative Spektren gezeigt (ohne Peptid = schwarz; mit Pep46 = rot; mit Pep71 = blau, mit PepC = grün). **(a)** Die Bindung von PepC führt zu einer Verbreiterung des Spektrums und einer verminderten *peak*-Höhe, die für eine leichte Immobilisierung der Radikalsonde in SurAI_Q191C spricht. **(b)** Die Anwesenheit von Pep46 und Pep71 führt zu einer Änderung der Spektren, die auf eine Zunahme der Mobilität der Sonde MTSSL schließen lässt. Die Anwesenheit von PepC hat keinen Einfluss auf das Spektrum. **(c)** In Anwesenheit der Peptide Pep46 und PepC weisen die Spektren ein etwas geringeres Splitting auf als ohne Peptid. Für SurAI_M231C **(d)** und SurAI_V263C **(f)** sind in Anwesenheit der getesteten Peptide keine Änderungen der Spektren zu detektieren. **(e)** Die Bindung von Pep46 an SurAI_E238C führt zu einer leichten Immobilisierung von MTSSL, die sich in einer geringen Abflachung und Verbreiterung des Spektrums zu erkennen gibt. In Anwesenheit von PepC ist dieser Effekt geringer ausgeprägt.

ERGEBNISSE

Die Aminosäurereste M231, E238 und V263 sind im SurANICt-PepC-Kristall unmittelbar an der Bindung des Peptides involviert. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Position M231, die sich direkt in der Peptidbindetasche befindet. Die ESR-Spektren der Variante SurAI_M231C-MTSSL zeigten jedoch mit allen getesteten SurA-bindenden Peptiden einen unveränderten Verlauf und lieferten somit keine Hinweise auf eine Bindung der Peptide in dieser Position von SurA (Abb. 15d). In nachfolgenden Untersuchungen wurde daher überprüft, ob durch die Mutation M231C bzw. die Markierung mit der Radikalsonde MTSSL möglicherweise die Faltung oder die Peptidbindung des Proteins beeinträchtigt sind (4.1.4).

Im SurA-Gesamtprotein war die Position E238 zwar für eine Markierung mit MTSSL zugänglich, doch aufgrund des hohen Immobilisierungsgrades der Radikalsonde war eine Aussage über mögliche Peptid-Interaktionen nicht möglich (*data not shown*). In SurAI ist diese Position, die sich am Rande der postulierten Bindetasche befindet und vermutlich an der Bindung beteiligt ist, frei zugänglich [Xu *et al.*, 2007]. Die ESR-Spektren des MTSSL-markierten SurAI_E238C-Proteins zeigten bei Anwesenheit der SurA-bindenden Peptide jedoch nur geringfügige Änderungen (Abb. 15e). Peptid Pep46 und in etwas geringerem Maße PepC führten zu einer leichten Abflachung und Verbreiterung der Spektren, die für eine leicht verstärkte Immobilisierung von MTSSL sprechen. Die Anwesenheit von Pep71 führte ebenfalls zu einer geringfügigen Abflachung des Spektrums. Allerdings blieb der *peak-to-peak*-Abstand unverändert, so dass in diesem Fall nicht von einer Immobilisierung der Radikalsonde ausgegangen und der Effekt somit für die weitere Betrachtung vernachlässigt wurde (persönliche Kommunikation D. Marsh). Die Anwesenheit der Peptide Pep54 und Pep95 hatte keinen Effekt auf die Spektren des Proteins SurAI_E238C-MTSSL (*data not shown*).

Der Aminosäurerest V263 liegt am oberen Rand der postulierten Bindetasche und könnte somit auch an der Peptidbindung beteiligt sein. Die bisher mit der Variante SurAI_V263C-MTSSL erhaltenen Ergebnisse lassen jedoch keine signifikanten Änderungen der Spektren in Anwesenheit der getesteten Peptide erkennen (Abb. 15f). Allerdings zeigte das Protein SurAI_V263C eine relativ hohe Tendenz zur Dimer-Bildung, so dass der Anteil MTSSL-markierter Monomere in den zur Analyse eingesetzten Proben und damit auch das resultierende Signal-zu-Rausch-Verhältnis der ESR-Spektren im Vergleich zu denen anderer SurAI-Varianten geringer war. Mögliche kleine Veränderungen in den Spektren sind so nicht detektierbar. Um eine eindeutige Aussage bezüglich einer möglichen Beteiligung dieser Position an der Peptidbindung treffen zu können, müsste zunächst das Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch Erhöhung der Konzentration an MTSSL-markierten Monomeren optimiert werden.

Insgesamt war der Nachweis einer spezifischen SurA-Peptid-Interaktion mit Hilfe der ESR-Spektroskopie als nur bedingt möglich, da in vielen Fällen nur sehr geringfügige Änderungen der Spektren zu beobachten waren. Sogar die Bindung von PepC an die Parvulin-Domäne I von SurA, die proteinkristallographisch nachgewiesen ist [Xu *et al.*, 2007], hatte nur geringen Einfluss auf die Spektren von Radikalsonden im unmittelbaren Bereich der postulierten Peptidbindestelle. Zur Identifikation weiterer, gegebenenfalls auch unspezifischer Substratbindestellen in SurA wurde dieses experimentelle Verfahren daher als nur bedingt geeignet bewertet und im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

4.1.4 Analyse der Funktionalität und der Sekundärstruktur des Proteins SurAI_M231C

Die Position M231 liegt zentral in der von [Xu *et al.*, 2007] postulierten Bindestelle (Abb. 11a), woraufhin, wie in Kap. 4.1.3 beschrieben, eine Interaktion des Proteins SurAI_M231C-MTSSL mit Peptiden in der ESR-Spektroskopie analysiert wurde. In den Untersuchungen konnte jedoch keine Interaktion mit den verwendeten Peptiden nachgewiesen werden. Daraufhin wurde einerseits die Kapazität des Proteins SurAI_M231C zur Bindung von Peptid in einem Fluoreszenz-basierten Assay, andererseits die Ausprägung der Sekundärstruktur mittels *Circular Dichroism Spectroscopy* (CD-Spektroskopie) untersucht.

4.1.4.1 Analyse der Sekundärstrukturen der Proteine SurAI und SurAI M231C mittels *Circular Dichroism Spectroscopy* (CD-Spektroskopie)

Das Defizit von SurAI_M231C zur Bindung von Peptid könnte durch eine durch die Mutation M231C induzierte Änderung der Protein-Konformation zu erklären sein. Um dies näher zu untersuchen wurden die Proteine SurAI und SurAI_M231C anhand ihrer Sekundärstruktur miteinander verglichen.

Eine geeignete Methode für die Analyse der Sekundärstruktur ist die *Circular Dichroism Spectroscopy* (CD-Spektroskopie). Mit ihrer Hilfe kann man Aussagen darüber treffen, ob zwei Proteine gleich bzw. ähnlich gefaltet sind und den Gehalt an gefalteten und ungefalteten Bereichen miteinander vergleichen [Simpson, 2008]. Aus der Intensität und dem Verlauf von CD-Signalen ist es möglich Rückschlüsse über konformationelle Änderungen zu treffen [Kelly, 2006]. Da in der Arbeitsgruppe die dafür notwendige Expertise nicht vorhanden war, wurden diese Versuche in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Jörg Kleinschmidt (Fachbereich Biologie: Biophysik der Faltung von Membranproteinen, Universität Konstanz, heute Kassel) durchgeführt.

Um aussagekräftige CD-Spektren zu erhalten, müssen die Proteine möglichst rein und in einem Puffer gelöst sein, der möglichst wenig im UV-Bereich absorbiert [Kelly *et al.*, 2005]. Daher wurden die in *E. coli* rekombinant produzierten und chromatographisch mittels IMAC und Gelfiltration gereinigten Proteine über Nacht gegen 10 mM HEPES, pH 8,0 dialysiert. Die Messung der CD-Spektren und die anschließende Auswertung erfolgten durch PD Dr. Kleinschmidt und seine Mitarbeiter an der Universität Konstanz (heute Kassel).

SurAI und SurAI_M231C wiesen in der CD-Spektroskopie eine vergleichbare Linienform auf (Abb. 16). Dies spricht dafür, dass Wildtyp und Mutante die gleiche Sekundärstruktur besitzen und aus diesem Grund sehr wahrscheinlich auch identisch gefaltet sind. Unterschiede in der Amplitude können aller Wahrscheinlichkeit nach auf leicht unterschiedliche Konzentrationen der Proteine zurückzuführen sein. Aufgrund des ungleich höheren Signal-zu-Rausch Verhaltens im Bereich 195 – 200 nm des Protein-CD-Spektrums weist das Wildtyp-SurAI-Protein eine etwas veränderte Linienform auf. Hierbei handelt es sich um ein Artefakt, welches bisher nicht eliminiert werden konnte (persönliche Kommunikation mit PD Dr. J. Kleinschmidt).

Die detailliertere Analyse der Zusammensetzung der Sekundärstruktur ergab für beide Proteine einen β -Faltblatt-Anteil von etwa 29 – 32 %, welches weitestgehend mit dem Wert aus der Kristallstruktur übereinstimmt (ca. 28 %). Die α -helikalen Anteile betragen zwischen 15 – 16 %.

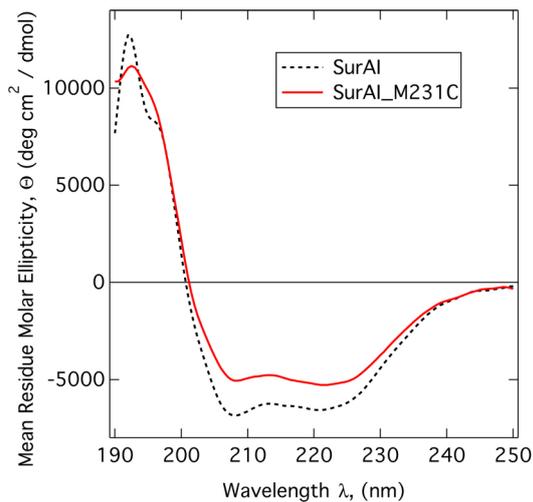


Abb. 16: Sekundärstrukturanalyse von SurAI und SurAI_M231C mittels Circular Dichroism Spectroscopy (CD-Spektroskopie). Dargestellt sind die CD-Spektren von SurAI und SurAI_M231C, die nach der Analyse in der Abteilung von PD Dr. J. Kleinschmidt (Universität Konstanz) erhalten wurden. Aus der vergleichbaren Linienform kann man schließen, dass SurAI-Wildtyp und SurAI_M231C die gleiche Sekundärstruktur aufweisen. Unterschiede in der Amplitude sind wahrscheinlich auf leicht unterschiedliche Konzentrationen der beiden Proteine zurückzuführen. Bei der, aufgrund des höheren Signal-zu-Rausch Verhältnisses im Bereich 195 – 200 nm veränderten Linienform von SurAI handelt es sich um ein Artefakt.

Möglicherweise ist die CD-Analyse hier nicht ganz korrekt, denn laut der Kristallstruktur erhält man einen höheren Anteil an α -Helices (ca. 35 %). Dies könnte jedoch auch durch Fehlinterpretationen des verwendeten Programms zur Analyse der Kristallstruktur begründet werden, da dieses möglicherweise kurze Turns fälschlicherweise als Helices identifiziert (persönliche Kommunikation PD Dr. J. Kleinschmidt).

Da beide Proteine in dieser Analyse weitestgehend in ihrer Sekundärstruktur übereinstimmen, wurde eine Störung der Faltung als Grund für die nicht messbare Peptidbindung ausgeschlossen.

4.1.4.2 Analyse der Interaktion von SurAI und SurAI_M231C mit fluoreszenzmarkierten Peptiden

Zur Überprüfung, ob SurAI_M231C noch in der Lage ist Peptide zu binden, wurde ein Fluoreszenz-basierter Assay durchgeführt. In der Dissertation von Gerrit Hennecke und in verschiedenen anderen Publikationen wurde gezeigt, dass ein IAANS-markiertes Peptid genutzt werden kann, um eine Interaktion mit einem Protein zu beobachten [McCarty *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 2000; Patzelt *et al.*, 2001; Hennecke, 2006]. Das Fluorophor IAANS (2-(4-iodoacetamido) Anilino-Naphtalen-6-Sulfonsäure) ist für Bindungsstudien von Peptiden an Proteine geeignet, da es in Wasser eine relativ geringe Fluoreszenz aufweist. Die Intensität der Fluoreszenz steigt jedoch rapide an, wenn das Fluorophor in eine weniger polare Umgebung überführt wird, was man als extrinsische Fluoreszenz bezeichnet [Freifelder, 1982]. IAANS wurde durch chemische Synthese an das C-terminale Cystein des Peptides Pep46 (DVHMDIFYWDISC) gekoppelt. Dieses Peptid entstammt einer Lamb-Peptid-Bibliothek, besitzt ein Ar-x-Ar-Motiv (Ar = aromatische Aminosäure) und ist als starker SurA-Binder identifiziert worden [Hennecke, 2006]. Bindet solch ein Fluorophor-markiertes Peptid an SurAI, sollte sich die

ERGEBNISSE

Quantenausbeute Q , also das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen, erhöhen. Es wurde in Fluoreszenz-basierten Kompetitions- und Affinitätsstudien bereits gezeigt, dass Pep46-IAANS eine spezifische Bindung sowohl mit SurA, als auch mit der Parvulin-Domäne II defizienten Variante SurANICt eingeht [Hennecke, 2006].

Zunächst wurden SurAI und SurAI_M231C rekombinant produziert. Von SurAI_M231C wurde eine Hälfte mit dem *spin-label* MTSSL markiert, die andere Hälfte lag ungelabelt vor. Die Versuche wurden nach zusätzlicher Reinigung mittels Gelfiltrations-Chromatographie durchgeführt. Für die Untersuchung der Interaktion durch Fluoreszenzspektroskopie wurden Ansätze der Proteine SurAI, SurAI_M231C bzw. SurAI_M231C-MTSSL (jeweils 400 nM) mit und ohne Peptid Pep46-IAANS (400 nM) bzw. die Peptide ohne Protein für 1 h bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Emissionsspektrum von 350 – 600 nm nach Anregung der Proben bei 335 nm gemessen (Fluoreszenzspektrophotometer RF-5301 PC, Shimadzu). Das Maximum der Emission lag bei ca. 450 nm. Die dargestellte Fluoreszenzintensität ist die Differenz zwischen dem gemessenen Wert und der Fluoreszenzintensität des jeweiligen markierten Peptids ohne die Zugabe von Protein [McCarty *et al.*, 1996].

Die Proteine SurAI, SurAI_M231C bzw. SurAI_M231C-MTSSL zeigten bei den Messungen keine Eigenfluoreszenz (Abb. 17). Die Kombination von SurAI mit Pep46-IAANS führte zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz, was auf einen Protein-Peptid-Komplex schließen lässt.

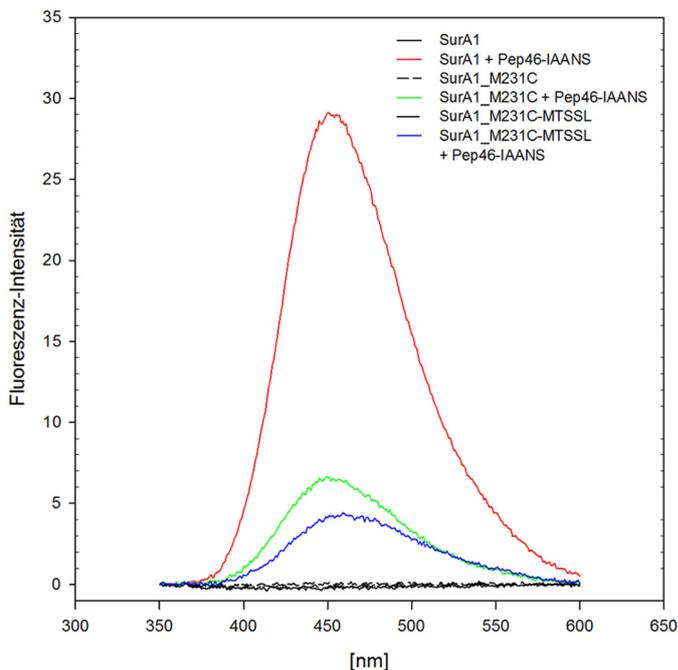


Abb. 17: Analyse der Interaktion von IAANS-markiertem Peptid mit SurAI-Proteinen. Dargestellt sind die Fluoreszenzspektren von SurAI, SurAI_M231C bzw. SurAI_M231C-MTSSL mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid Pep46-IAANS (DVHMDIFYWDISC-IAANS) nach Abzug des Spektrums des markierten Peptids ohne Protein. Die Proteine wurden in äquimolaren Mengen mit den IAANS-markierten Peptiden (je 400 nM) zur Erzeugung von Protein-Peptid-Komplexen für 1 h bei 30°C in F-Puffer inkubiert. Der SurAI-Pep46-IAANS-Komplex führte zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz-Intensität, was ein Zeichen für die Bindung des Peptides an diese Domäne ist. Für die Varianten mit der M231C-Mutation wurde ein wesentlich geringerer Fluoreszenz-Wert beobachtet. Somit ist diese Variante signifikant in ihrer Fähigkeit Peptide zu binden eingeschränkt.

Diese Ergebnisse, in Kombination mit den Daten aus der ESR-Spektroskopie, deuten stark darauf hin, dass sich die Interaktionsstelle für Pep46 in der PPIase-Domäne I von SurA befindet. Für die Proteine SurAI_M231C und SurAI_M231C-MTSSL zusammen mit Pep46-IAANS war nur ein moderater Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Das Maximum der Quantenausbeute war ca. 4 – 7-mal niedriger als bei der unmutierten Variante SurAI. Dies spricht dafür, dass SurAI_M231C in geringem Maße in der Lage ist, Peptid zu binden. Aber die Mutation M231C schränkt die Fähigkeit zur Peptidbindung vermutlich so stark ein, dass diese in der EPR-Spektroskopie nicht mehr zu detektieren ist.

4.2 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels des ToxR-Systems

In Anwesenheit eines artifiziellen Peptides ist in der Kristallographie eine Dimerisierung von zwei SurANICt-Untereinheiten beobachtet worden ([Xu *et al.*, 2007] und dargestellt in Abb. 4 e-g). Aus diesem Grund sollte analysiert werden, in wie weit die Dimerisierung von SurA für die Peptidbindung sowie die Funktionalität des SurA-Proteins *in vivo* notwendig ist oder, ob es sich dabei eventuell um ein Artefakt aus der Kristallographie handelt. Des Weiteren wurde die Peptidbindestelle in der Parvulin-Domäne I von SurA in der ESR-Spektroskopie näher untersucht und Indizien erhalten, dass es noch weitere Substrat-Bindungsstellen innerhalb des SurA-Proteins gibt (4.1.3). Konkrete Hinweise auf die Lokalisierung dieser zusätzlichen Substrat-Bindungsstellen sind bisher nicht erhalten worden. Mit Hilfe des ToxR-abhängigen genetischen Indikatorsystems kann das Ausmaß der Dimerisierung eines ToxR-Fusionsproteins ermittelt werden. Diese Dimerisierung kann durch Homodimerisierung des Fusionsproteins, theoretisch aber auch durch die gemeinsame Bindung zweier Fusionsproteine in unmittelbarer Nachbarschaft an ein Substrat vermittelt werden. Ziel der Versuche war es, potentielle Bindungsstellen für das Substrat in SurA zu identifizieren und zu analysieren, ob die Dimerisierung für die Funktionalität des SurA-Proteins essentiell ist.

Protein-Protein-Interaktionen können mittels eines genetischen Indikatorsystems untersucht werden. Hierzu wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte ToxR-System herangezogen. ToxR ist in *Vibrio cholerae* Bestandteil der Regulierung der Expression der Virulenzgene [DiRita, 1992] und wird indirekt durch die *ctxAB*-Gene aktiviert [DiRita *et al.*, 1991; Higgins *et al.*, 1992]. Bei Einsatz des ToxR-Proteins in dem heterologen Wirt *E. coli* wird die Transkription über den *ctx*-Promotor direkt aktiviert [Miller and Mekalanos, 1984]. Um diese Transkription detektieren zu können, verfügt der verwendete Expressionsstamm FHK über eine chromosomale *ctx::lacZ* Reporterfusion.

Das hierbei verwendete ToxR-Protein verfügt über einen cytoplasmatischen N-Terminus, ein Transmembransegment und einen C-Terminus, der gegen das zu untersuchende Protein substituiert werden kann, ohne dass die Transkriptionsaktivierung des *ctx*-Promotors eingeschränkt wird [Kolmar *et al.*, 1995]. Ohne eine Interaktion der Fusionsproteine liegt der Transkriptionsaktivator als Monomer vor und ist inaktiv. Eine Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der Fusionsproteine resultiert in einem aktiven Transkriptionsaktivator, der an den *ctx*-Promotor bindet und zur Transkription des fusionierten *lacZ*-Gens führt. Die daraufhin produzierte β -Galaktosidase katalysiert den Umsatz von *o*-Nitrophenyl- β -D-

Galaktopyranosid (oNPG) zu Galaktose und dem gelbgefärbten *o*-Nitrophenol. Basierend auf der Intensität der Gelbfärbung kann auf die Aktivität der β -Galaktosidase rückgeschlossen werden [Miller, 1972].

Als Kontroll-Fusionsprotein wurde das Maltose-bindende Protein (MalE) verwendet [Kellermann and Szmelcman, 1974; Duplay *et al.*, 1984]. Das periplasmatische *E. coli*-Protein MalE wird in großen Mengen produziert [Kellermann and Szmelcman, 1974] und hat per se eine monomere Natur [Richarme, 1982]. Durch das C-terminale Anfügen der 33 Aminosäuren des Leucin-Zipper Proteins GCN4 (ZIP) aus *Saccharomyces cerevisiae* wird das MalE-Protein artifiziell zur Homodimerisierung gebracht [Hope and Struhl, 1987; O'Shea *et al.*, 1989; Blondel and Bedouelle, 1991].

4.2.1 Auswahl der Positionen für die Aufhebung der Substrat- bzw. Protein-vermittelten Interaktionen in SurA

Spezifische Positionen für Bindungspartner im SurA-Protein waren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt. Erste Hinweise lieferte die Publikation von [Xu *et al.*, 2007], in der das SurA-Protein ohne die PPIase-aktive Parvulin-Domäne II in Gegenwart eines artifiziellen Substrats kristallisiert wurde. In diesem Zusammenhang konnten die Autoren zeigen, dass der Austausch der Aminosäuren M231 bzw. L239 in der PPIase-inaktiven Parvulin-Domäne I gegen Arginin zu einer verminderten Peptidbindung führte. Somit wurden diese beiden Aminosäure ebenfalls für die Analyse im ToxR-Assay ausgewählt. Zusätzlich wurden mit Hilfe der verfügbaren Strukturdaten die Positionen F243 und V263 für die Interaktion mit Substrat in der Parvulin-Domäne I ausgewählt, da diese auch an der Substratbindung direkt beteiligt sein könnten [Xu *et al.*, 2007].

Die Parvulin-Domäne II von SurA, die die PPIase-Aktivität des Proteins vermittelt [Behrens *et al.*, 2001], war in den SurA-Peptid-Kristallstrukturen deletiert [Xu *et al.*, 2007]. Aus diesem Grund konnte diese Domäne nicht anhand verfügbarer struktureller Daten direkt analysiert werden. Die Struktur der Parvulin-Domäne und auch die Peptidbindestelle innerhalb der Parvulin-Domänen ist hoch konserviert [Bayer *et al.*, 2003; Kuhlewein *et al.*, 2004; Weininger *et al.*, 2010]. Diese an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren sind auch in der PPIase-inaktiven Parvulin-Domäne I von SurA an der im Kristall beobachteten Peptidbindung beteiligt [Xu *et al.*, 2007]. Aufgrund dessen wurde angenommen, dass auch die komplementären Aminosäuren innerhalb der Parvulin-Domäne II an der Substratbindung beteiligt sein könnten, da diese PPIase-aktiv ist und somit auch Substrat binden können sollte. Innerhalb der Parvulin-Domäne I von SurA wurden die Aminosäuren M231, L239 und F243 für die Analyse im ToxR-Assay ausgewählt. Basierend auf dem Vergleich der Aminosäuresequenzen wurden die hierzu komplementären Aminosäuren L341, F349 und F353 in der Parvulin-Domäne II für die weitere Analyse ausgewählt. Eine graphische Darstellung der Position der ausgewählten Aminosäuren innerhalb der Parvulin-Domänen und den Vergleich der Aminosäuresequenzen findet sich in Abb 18.

Weiterhin sollte die Relevanz der Dimerisierung für die *in vivo* Funktion des SurA-Proteins analysiert werden. Auf Basis der Strukturdaten des SurA-Peptid-Dimers ([Xu *et al.*, 2007], PDB ID: 2PV3) wurden spezifische Positionen an den Kontaktstellen des SurA-Dimers für die Analyse ausgewählt.

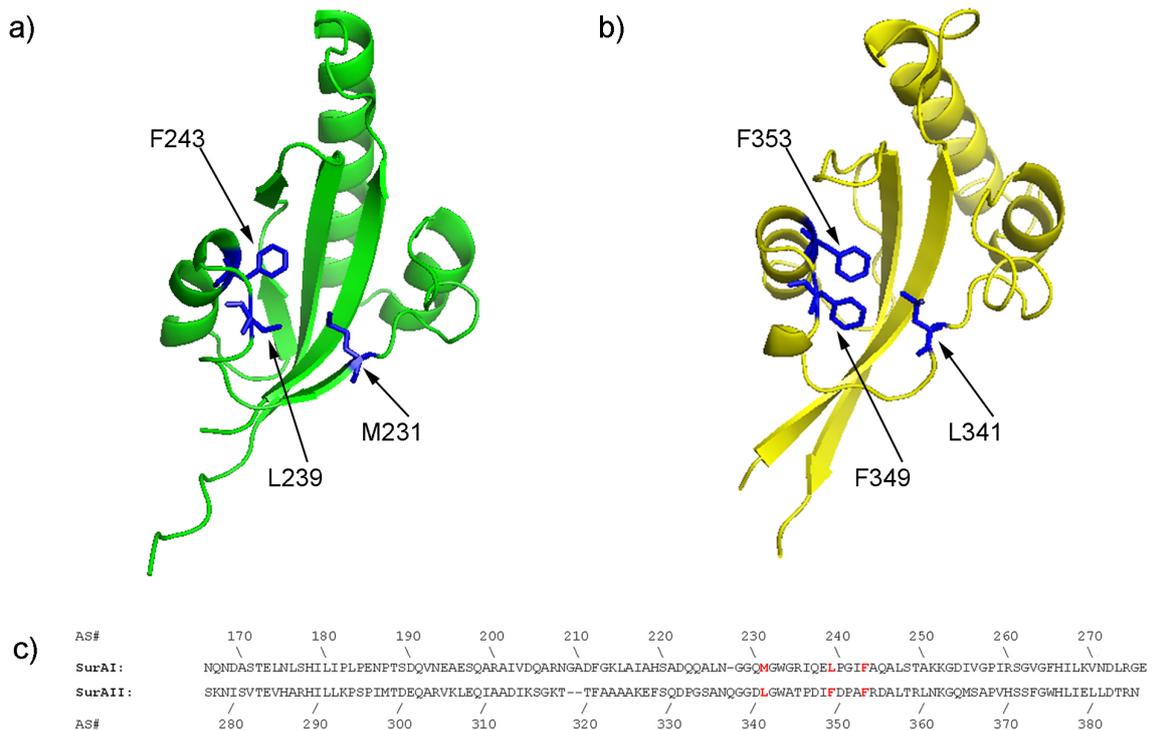


Abb. 18: Vergleich von Struktur und Sequenz der Parvulin-Domänen I und II des periplasmatischen Chaperons SurA.

Die Parvulin-Domänen von SurA sind sich strukturell sehr ähnlich. Für die Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren für den ToxR-Assay wurden die Parvulin-Domänen sowohl strukturell als auch sequenziell miteinander verglichen. Auf Basis der in Parvulin-Domäne I analysierten Aminosäuren wurden die zu diesen komplementären Aminosäuren aus Parvulin-Domäne II ausgewählt. **a)** Darstellung der Struktur der isolierten Parvulin-Domäne I von SurA. Farblich markiert sind die im ToxR-Assay analysierten Aminosäuren M231, L239 und F243. **b)** Darstellung der Struktur der isolierten Parvulin-Domäne II von SurA. Farblich markiert sind die im ToxR-Assay analysierten Aminosäuren L341, F349 und F353, die zu den in Parvulin-Domäne I ausgewählten Positionen komplementär sind. **c)** Aminosäure-Sequenzvergleich der Parvulin-Domänen I und II des SurA-Proteins. Die Nummerierung der Aminosäuren im SurA-Gesamtprotein ist angegeben. Farblich markiert sind die Aminosäuren in Parvulin-Domäne I und Parvulin-Domäne II, die im ToxR-Assay analysiert wurden. Die dargestellten Strukturen wurden modifiziert nach [Bitto and McKay, 2002] (PDB ID: 1M5Y). AS# = Aminosäurenummer im SurA-Gesamtprotein

Der hauptsächliche Kontakt zwischen beiden Proteinen erfolgte über die C-Termini. Hierbei scheinen vor Allem die elektrostatischen Wechselwirkungen von D395 und M402 Einfluss auf die Bildung von Protein-Protein-Interaktionen zu haben. Aufgrund der räumlichen Orientierung dieser Seitenketten wurden diese für die weitere Analyse ausgewählt. Ein weiterer Interaktionspunkt ist in der N-terminalen Helix 6, wobei die drei Positionen Q155, E158 und S159 aufgrund ihrer räumlichen Orientierung und der daraus resultierenden Wechselwirkung für den Zusammenhalt verantwortlich scheinen.

Mit dem Ziel, die Dimerkontakte aufzuheben, um so die Relevanz der Dimerisierung für die *in vivo* Funktion von SurA zu untersuchen, sowie potentielle Substrat-Interaktionspartner zu identifizieren, sollten die oben genannten Aminosäuren gegen eine alternative Aminosäure ausgetauscht und der daraus resultierende Effekt auf die Dimerisierungsfähigkeit analysiert werden.

4.2.3 Generierung der Plasmide und Interaktions-Mutanten für die ToxR-Assays

Die benötigten Ausgangsplasmide für den ToxR-Assay waren in der Arbeitsgruppe schon vorhanden. Somit konnten die Vektoren pHKToxR'SurA, pHKToxR'SurANICt, pHKToxR'SurANIICt, pHKToxR'SurAI, pHKToxR'SurANCt und pHKToxR'SurAI+II für die vorgesehenen Mutationsanalysen verwendet werden.

Eine Zusammenfassung der ausgewählten Positionen für die Analyse im ToxR-Assay findet sich in Tabelle 30. Die ausgewählten Mutationen wurden sowohl einzeln, als auch in verschiedenen Kombinationen in die oben genannten Vektoren eingeführt.

Um eine größtmögliche Wirkung der ausgetauschten Aminosäure zu erreichen, wurden die ursprünglichen Aminosäuren auf molekularer Ebene (auf DNA-Ebene) gegen eine Aminosäure mit möglichst entgegengesetzter Eigenschaft ausgetauscht. So wurden unpolare, ungeladene polare und aromatische Aminosäuren gegen geladene polare Aminosäuren bzw. umgekehrt ersetzt.

Der Austausch der Aminosäuren auf molekularer Ebene erfolgte durch den Austausch des entsprechenden Basentriplets in der Plasmid-DNA. Hierfür wurden zunächst anhand der Gensequenz spezifische *Primer* definiert, die an der gewünschten Position das Basentriplett der einzuführenden Aminosäure besitzt. Die Einführung der Mutation mittels der spezifisch definierten *Primer* erfolgte durch *quick change mutagenesis* PCR (QC-PCR). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden transformiert und die erhaltenen Klone mittels Sequenzierung verifiziert.

Tab. 30: Aufstellung der im ToxR-Assay analysierten Aminosäuren des SurA-Proteins. Um einen möglichst großen Effekt in der späteren Analyse zu erhalten wurden die ausgewählten Aminosäuren jeweils gegen eine Aminosäure mit entgegengesetzter biochemischer Ladung substituiert. Die jeweilige Ladung der angegebenen Aminosäure ist in der Tabelle in Klammern angegeben.

SurA-Domäne	Aminosäureposition	Austausch gegen
PPIase Domäne I	M231 (ungeladen polar)	R (geladen polar)
	L239 (unpolar)	D (geladen polar)
	F243 (aromatisch)	D (geladen polar)
	V263 (unpolar)	R (geladen polar)
PPIase Domäne II	L341 (unpolar)	D (geladen polar)
	F349 (aromatisch)	D (geladen polar)
	F353 (aromatisch)	D (geladen polar)
NCt-Domäne	„H6M3“	
	- Q155 (ungeladen polar)	- A (unpolar)
	- E158 (geladen polar)	- A (unpolar)
	- S159 (ungeladen polar)	- A (unpolar)
	D395 (geladen polar)	A (unpolar)
	M402 (ungeladen polar)	R (geladen polar)

4.2.4 Analyse der *in vivo*-Funktion der im ToxR-Assay verwendeten SurA-Varianten

Vor dem Einsatz der Interaktionsmutanten im ToxR-Assay wurden diese mittels eines *in vivo* Komplementationstest hinsichtlich ihrer Funktionalität analysiert. Hierbei wurde untersucht, ob die Plasmid-kodierten ToxR[']SurA-Fusionsproteine in der Lage sind, den letalen Phänotypen einer *surA skp*-Doppelmutante zu komplementieren. In dem Stamm SB44452 (Laborsammlung) ist das *skp*-Gen deletiert (Δskp *zae-3095::Tn10Km*) und das chromosomale *surA*-Gen steht unter Kontrolle eines IPTG-regulierbaren Promotors ($P_{LacO-1-surA}$). Da eine gleichzeitige Deletion des *surA*- und des *skp*-Gens zu einem synthetisch letalen Phänotypen führt [Behrens *et al.*, 2001; Rizzitello *et al.*, 2001], ist der Stamm nur in Anwesenheit von IPTG oder eines die Funktion von SurA komplementierenden Plasmid-kodierten Proteins lebensfähig (schematische Darstellung Abb. 19a).

Die zu testenden Plasmide wurden frisch in den Stamm SB44452 transformiert, über Nacht in IPTG-haltigem Selektionsmedium angezogen und ausgehend von einer OD₆₀₀ von 4,0 gleiche Volumina der Verdünnungsstufen 10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁵ und 10⁻⁷ auf Selektionsplatten mit und ohne den Induktor IPTG aufgetropft. Die Inkubation der betroffenen Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

Zunächst wurden die unmutierten SurA-ToxR-Varianten, sowie ToxR[']MalE und ToxR[']MalEGCN im Komplementations- bzw. Tropftest untersucht (Abb. 19b). Hierbei zeigte sich, dass ToxR[']SurA, ToxR[']SurANcT, ToxR[']SurANiCt und ToxR[']SurANIICt den synthetisch letalen Phänotypen des Stammes SB44452 komplementieren. Die anscheinend etwas schlechtere Komplementation durch ToxR[']SurANcT ist auf weniger aufgetragene Zellen zurückzuführen, da auch mit IPTG ein schlechteres Wachstum zu beobachten war. In den folgenden Tropftests hat auch diese Variante vergleichbar zu ToxR[']SurA-Wildtyp komplementiert. Die Kompensation des synthetisch letalen Phänotyps des *surA skp*-Stammes ist auf das Vorhandensein des für die Chaperon-Funktion notwendigen und ausreichenden Bereiches SurANcT zurückzuführen [Behrens *et al.*, 2001]. Fehlt dieser Teil des Proteins, wie in ToxR[']SurAI und ToxR[']SurAI+II, sind diese Proteinfragmente nicht mehr in der Lage die Lebensfähigkeit des Stammes wiederherzustellen. Aus diesem Grund wurden die Varianten von SurAI und SurAI+II im Folgenden nicht weiter im Tropftest untersucht.

Zusätzlich zu den ToxR-SurA-Fusionsproteinen wurden auch die ToxR-Varianten von MalE und MalEGCN hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Wiederherstellung der Lebensfähigkeit von SB44452 untersucht. Das periplasmatische Maltose-bindende Protein (MBP) MalE bindet spezifisch Maltose und Maltodextrin [Schwartz *et al.*, 1976; Wandersman *et al.*, 1979]. Sowohl ToxR[']MalE als auch ToxR[']MalEGCN sind nicht in der Lage die Funktion von SurA zu übernehmen und den synthetisch letalen Phänotypen zu komplementieren.

Um die Vergleichbarkeit und die Funktionalität der Tropftests zu gewährleisten, wurden in den weiteren Versuchen immer ToxR[']SurA als Positiv-Kontrolle und ToxR[']MalE als Negativ-Kontrolle verwendet.

Im Chaperon-Modul NcT von SurA waren ausgewählte Positionen einzeln, sowie in Kombinationen mutiert worden, um die im Kristall beobachteten Kontakte zwischen den C-terminalen Helices (M402R, D395A) und den Helices 3 und 6 im N-Terminus (H6M3 = Q155A E158A S159A) aufzuheben.

ERGEBNISSE

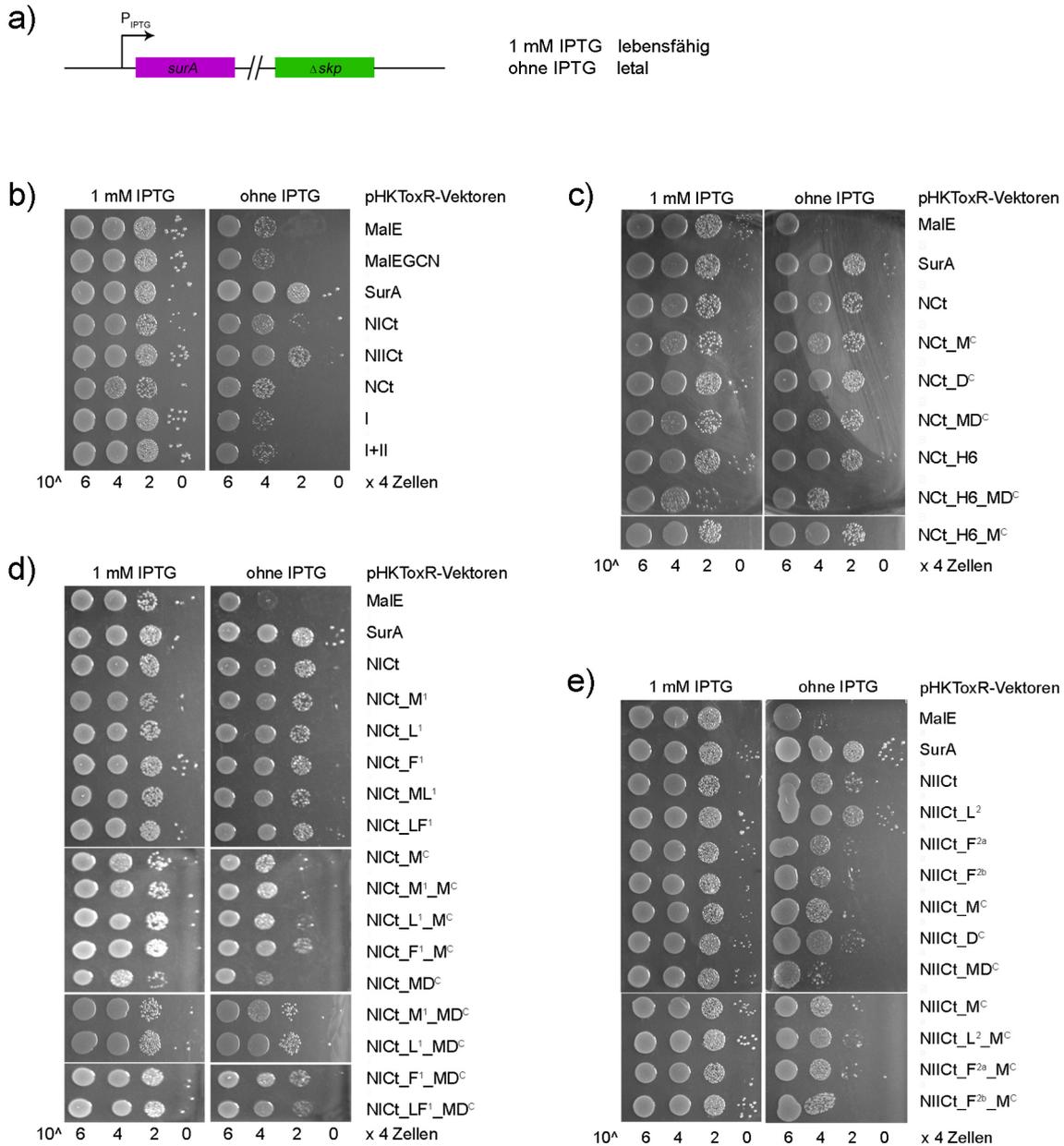


Abb. 19: Komplementation des konditional letalen Phänotyps des Stammes *P_{Lac-O1}-surA Δskp* (SB44452) durch pHKToxR'SurA-Plasmide. Wachstum des SurA-Depletionsstammes SB44452 in Anwesenheit von ToxR-Fusions-Plamiden. **(a)** Schematische Darstellung der Funktion des Tropftests. Die zu untersuchenden Kulturen wurden über Nacht in IPTG-haltigem Medium angezogen und ausgehend von einer OD₆₀₀ von 4,0 wurden Verdünnungsstufen von 10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁵ und 10⁻⁷ Zellen/ml hergestellt. Von diesen wurden jeweils 10 µl auf LB-Platten mit Spec Km Cm⁺. IPTG aufgetropft und bei 37°C für 16 – 24 h inkubiert. Gezeigt ist die Analyse der Komplementation des synthetisch letalen Phänotyps des Stammes SB44452 mit **(b)** den unmutierten ToxR-SurA-Varianten, sowie den mutierten Varianten im Vergleich zu den jeweiligen unmutierten Varianten mit **(c)** ToxR'SurANcT, **(d)** ToxR'SurANICt und **(e)** ToxR'SurANIIcT. Abkürzungen: NIcT = SurANICt, NIICt = SurANIIcT, NCt = SurANcT, I = SurAI, I+II = SurAI+II, M^C = M402R, D^C = D395A, MD^C = M402R D395A, H6 = H6M3 (Q155A E158A S159A), M¹ = M231R, L¹ = L239D, F¹ = F243D, ML¹ = M231R L239D, LF¹ = L239D F243D, L² = 341D, F^{2a} = F349D, F^{2b} = F353D.

Im Tropftest zeigte sich, dass alle ToxR'SurANcT-Varianten mit diesen Mutationen die Lebensfähigkeit von SB44452 im gleichen Maße wie die unmutierte Variante ToxR'SurANcT wiederherstellen konnten (Abb. 19c). Auch wenn die Variante ToxR'SurANcT_H6M3_MD scheinbar etwas schlechter

komplementiert als die anderen ToxR'SurANcT-Varianten, so ist dies auf eine bei diesem Tropftest etwas geringere eingesetzte Zellzahl zurückzuführen, da auch auf der IPTG-haltigen Platte ein etwas geringeres Wachstum zu sehen ist.

Zur Untersuchung der Variante ToxR'SurANICt wurden Mutationen im C-Terminus (M402R, D395A) und in der Parvulin-Domäne I (M231R, L239D, F243D) einzeln, sowie in unterschiedlichen Kombinationen in das *surA*-Gen eingeführt. Im Tropftest zeigte sich, dass die Mutationen in der Parvulin-Domäne I keinen Einfluss auf die Funktionalität von SurA haben (Abb. 19d). Auch ihre Kombination mit Mutationen im C-Terminus hatte keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Varianten den konditional letalen Phänotypen zu komplementieren. Die anscheinend schlechtere Kompensation des Wachstumsdefektes durch die mit M402R kombinierten Varianten und durch ToxR'SurANICt_MD kann im Vergleich mit der IPTG-haltigen Platte ebenfalls mit einer leicht verminderten Zellzahl begründet werden.

Bei der Variante ToxR'SurANIICt wurden sowohl Mutationen im C-Terminus (M402R, D395A), als auch Mutationen in der Parvulin-Domäne II (L341D, F349D, F353D) jeweils einzeln als auch in unterschiedlichen Kombinationen eingeführt. Dabei zeigte sich, dass diese Einfach- oder Mehrfachmutationen zu keinem bzw. zu einem leichten Verlust der Komplementationsfähigkeit im Vergleich zum unmutiertem ToxR'SurANIICt führen (Abb. 19e). Einen signifikanten Verlust der *in vivo*-Funktion der Proteine bildet die Doppelmutation MD im C-Terminus von SurA.

4.2.5 Untersuchung der Substrat- bzw. Protein-vermittelten Interaktion von SurA-Fusionsproteinen (unmutierte SurA-Varianten)

In der Arbeitsgruppe was die Dimerisierungsfähigkeit der unmutierten ToxR'SurA-Proteine im Vorfeld bereits untersucht worden. Als Referenz für die eigenen Versuche wurden diese Versuche zunächst im Rahmen dieser Arbeit wiederholt. Hierbei wurden die SurA-Varianten ToxR'SurA, ToxR'SurANICt, ToxR'SurANIICt, ToxR'SurANcT, ToxR'SurAI und ToxR'SurAI+II zusammen mit den Kontrollproteinen ToxR'MalE und ToxR'MalEGCN im ToxR-Assay analysiert (Details zur Methodik s. 3.5.3). Ein Versuch bestand aus jeweils 5 parallelen Ansätzen. Für jeden Ansatz wurde die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität des Zellextrakts ermittelt. Dargestellt im Balkendiagramm sind die Mittelwerte der β -Galaktosidase-Aktivität in Miller Units und die jeweiligen Standardabweichungen (Abb. 20a). Der Stamm FHK zeigt nahezu keine Hintergrund-Aktivität. Die Negativkontrolle ToxR'MalE führt nur zu einem geringen Wert für die β -Galaktosidase-Aktivität, wohingegen die zur Dimerisierung fähige Variante ToxR'MalEGCN eine wesentlich stärkere Aktivierung des *ctx*-Promotors vermittelt und damit zu einer deutlich höheren β -Galaktosidase-Aktivität führt. Die Fusionsproteine ToxR'SurA, ToxR'SurANICt, ToxR'SurANIICt und ToxR'SurANcT zeigen eine sehr starke Dimerisierung oder auch Oligomerisierung, da sie zu hohen β -Galaktosidase-Aktivitäten führen. Diese ist für die SurA-Varianten, denen eine oder auch beide Parvulin-Domänen fehlen, sogar höher als für das SurA-Gesamtprotein. Die Chaperon-Modul defizienten Varianten ToxR'SurAI und ToxR'SurAI+II hingegen vermitteln nur eine geringe Aktivierung des *ctx*-Promotors. Die resultierende β -Galaktosidase-Aktivität ist gegenüber der Negativkontrolle jedoch etwa 2 – 3-fach erhöht. Dies lässt auf eine geringe Dimerisierungsfähigkeit dieser Varianten schließen.

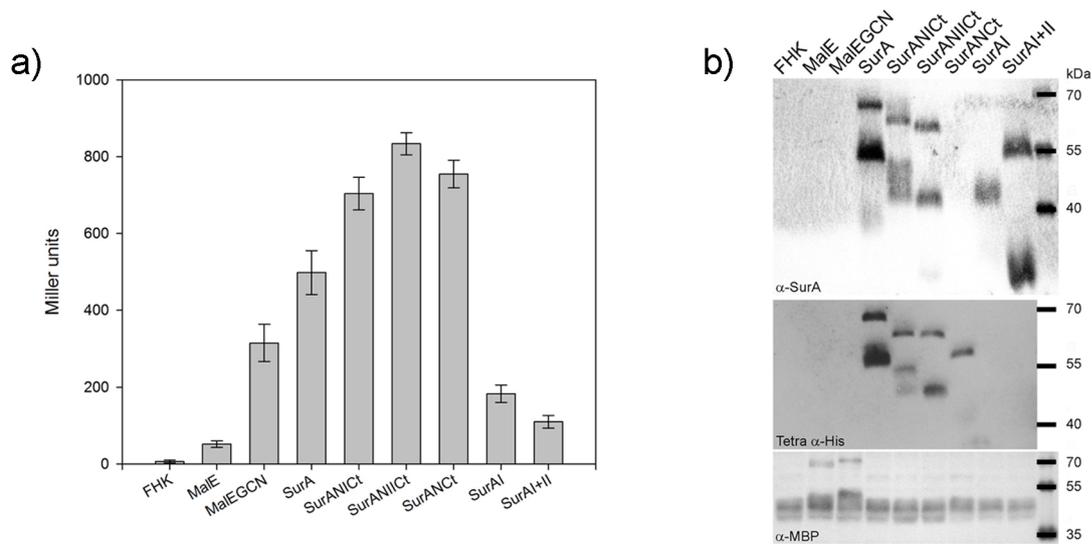


Abb. 20: Analyse der *cpx*-Transkriptionsaktivierung von ToxR'Fusionsproteinen. a) Die Aktivität des *cpx*-Promotors wurde durch die Messung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität in Zellextrakten ermittelt. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte und die Standardabweichungen aus 5 unabhängigen über Nacht-Kulturen. b) *Western Blot*-Analyse von Zellextrakten aus 5×10^7 Zellen/Spur (α -SurA, α -MBP) bzw. 10^8 Zellen/Spur (Tetra α -His). Die Detektion der ToxR'SurA-Fusionsproteine erfolgte mit α -SurA, mit Ausnahme des ToxR'SurANcT-Varianten, die von diesem Antikörper nicht erkannt wurden. Sie wurden über den C-terminalen His-tag mit Tetra α -His nachgewiesen. Die Varianten ToxR'SurAI und ToxR'SurAI+II besitzen keinen C-terminalen His-tag. Die oberen Banden in jeder Spur stellen die Hauptbande der ToxR-Fusion dar. Bei den unteren Banden handelt es sich um Abbauprodukte, die in den folgenden Abbildungen nicht gezeigt werden und für die Analyse nicht verwendet worden sind. Als interne Ladekontrolle wurde das periplasmatische Maltose-Bindeprotein MalE mit α -MBP detektiert.

Zusätzlich wurden die Fusionsproteine hingehend ihrer Konzentration in den Zellen analysiert. Hierzu wurden Aliquots aus den 5 parallelen Ansätzen vereinigt und die darin enthaltenen Proteine im *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 20b). Um eine genauere Aussage über die Bandenintensität der detektierten Proteine zu geben, wurden die *Western Blots* mit der Software Image J quantifiziert.

In der Arbeitsgruppe war ein polyklonales SurA-Serum vorhanden, das überwiegend gegen die Parvulin-Domänen von SurA gerichtete Antikörper enthielt und daher zur Detektion der Variante SurANcT im *Western Blot* nicht geeignet war. Daher erfolgte die Detektion der SurANcT-Varianten mit einem Antikörper gegen den C-terminalen His-tag des Proteins (Tetra α -His, Qiagen). Eine Detektion aller verfügbaren ToxR'SurA-Varianten mit diesem Antikörper war nicht möglich, da ToxR'SurAI und ToxR'SurAI+II nicht über einen His-tag verfügen.

Parallel wurde zu jedem *Western Blot* eine Ladungskontrolle durchgeführt. Hierfür wurde das periplasmatische Protein MalE genutzt, dessen zelluläre Konzentration in *E. coli* von SurA unbeeinflusst ist. Mit dem zur Detektion des Proteins verwendeten Antikörper α -MBP konnten zugleich auch die Fusionsproteine ToxR'MalE und ToxR'MalEGCN detektiert werden.

In den weiteren Versuchen wurde diese Ladekontrolle dazu verwendet, die Proteinmengen auf die geladene Menge Protein zu normieren. Um Diskrepanzen zu minimieren und Pipettier-Ungenauigkeiten zu vermeiden, wurde, sofern die zu erwartenden Proteingrößen es zuließen, die *Western Blots* zerschnitten

ERGEBNISSE

und die verschiedenen Teile des selben *Western Blots* mit unterschiedlichen Antikörpern behandelt. Die theoretischen Molekulargewichte der ToxR-Fusionsproteine wurden mit dem Programm Peptidesort (GCG-Package) von Frau Dr. habil. Behrens-Kneip im Vorfeld dieser Arbeit berechnet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die theoretischen Molekulargewichte betragen für die Fusionsproteine ToxR'MalE ~63 kDa, ToxR'MalEGCN ~68 kDa, ToxR'SurA ~67 kDa, ToxR'SurANICt ~60 kDa, ToxR'SurANIICt ~57 kDa, ToxR'SurANCt ~47 kDa, ToxR'SurAI ~34 kDa und ToxR'SurAI+II ~43 kDa. Für ToxR'MalE, ToxR'MalEGCN, ToxR'SurA, ToxR'SurANICt und ToxR'SurANIICt wurden auch im Western Blot Proteinbanden in vergleichbaren Höhen in Relation zum Proteinstandard detektiert. Bei den Fusionsproteinen ToxR'SurANCt, ToxR'SurAI und ToxR'SurAI+II verlaufen die detektierten Proteinbanden jeweils etwas höher als die theoretischen Molekulargewichte es erwarten ließen. Diese Beobachtung wurde in allen weiteren Analysen gemacht und war in der Arbeitsgruppe auch bekannt (persönliche Kommunikation Dr. habil. S. Behrens-Kneip).

4.2.6 Untersuchung der Substrat- bzw. Protein-vermittelten Interaktion von SurA-Fusionsproteinen (mutierte SurA-Varianten)

Der Einfluss ausgewählter Mutationen in SurA auf die Dimerisierungsfähigkeit wurde ebenfalls im ToxR-Assay untersucht. Um direkte Aussagen über den Effekt einzelner Mutationen vor dem Hintergrund des komplexen Interaktionsnetzwerks im SurA-Gesamtprotein treffen zu können, wurden einzelne Domänen oder Fragmente von SurA analysiert. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Abb. 21 und Tab. 31 dargestellt.

Jede Messreihe bestand aus 3 – 5 unabhängigen über Nacht Kulturen des zu untersuchenden Stammes. Zur Ermittlung der Mittelwerte wurden jeweils mindestens 2 unabhängige Messreihen herangezogen. Ausnahmen hierfür sind die Varianten ToxR'SurAI_V263R (ToxR'SurAI_V¹) und ToxR'SurAI_M231RV263R (ToxR'SurAI_MV¹). Bei diesen Varianten hat sich im ersten Versuch schon abgezeichnet, dass die Position V263R keinen Einfluss auf die Dimerisierung von SurA hat. Die von ToxR'SurAI_M231R (ToxR'SurAI_M¹) und von ToxR'SurAI_MV¹ vermittelte *ϕx*-Promotor-Aktivierung ist in gleichem Maße gegenüber dem Wildtyp verringert (ca. Faktor 2). Der Verlust der Dimerisierungsfähigkeit kann daher allein auf die Mutation M231R zurückgeführt werden.

Ebenso wurde der ToxR-Assay für die Varianten ToxR'SurANIICt_F349D (ToxR'SurANIICt_F^{2a}) und ToxR'SurANIICt_F349D_M402R (ToxR'SurANIICt_F^{2a}_M^c) jeweils nur einmal durchgeführt. Gemessen an der resultierenden β -Galaktosidase-Aktivität war die Dimerisierungsfähigkeit beider Proteine in vergleichbarem Maß gegenüber dem Wildtyp-Protein reduziert. Daher ist dieser Effekt vermutlich nicht auf die Mutation F349D, sondern wohl ausschließlich auf die Mutation M402R zurückzuführen.

Da die absoluten Werte der β -Galaktosidase-Aktivität in den ToxR-Assays schwankten, die Tendenzen jedoch vergleichbar waren, wurden für den Vergleich der ToxR'SurA-Varianten die relativen Werte dargestellt. Hierbei wurde die unmutierte SurA-Variante jeweils als 100 % festgelegt und die Werte der mutierten SurA-Varianten in Relation dazu gesetzt.

4.2.6.1 Analyse der ToxR'SurAI-Varianten

Bei dem Fusionsprotein ToxR'SurAI handelt es sich um die an das ToxR-Protein fusionierte isolierte Parvulin-Domäne I des SurA-Proteins. Bei dieser Variante wurden die Mutationen M231R (M¹), L239D (L¹), F243D (F¹) und V263R (V¹), sowie Kombinationen von diesen untersucht. Die Mutationen M231R, L239D und F243D, sowie die Kombination M231RL239D (ML¹) führten zu einer Verringerung der Dimerisierung des SurAI-Proteins um mehr als die Hälfte, auf nahezu das Niveau der Negativkontrolle ToxR'MalE (Abb. 21a). Die Proteinkonzentration im *Western Blot* ist bei diesem ToxR'SurAI-Varianten auch zum Teil stark abgesunken, aber nicht im vergleichbaren Maße, wie die Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität. Daher kann angenommen werden, dass die gemessene Verringerung der β -Galaktosidase-Aktivität nicht ausschließlich auf die verringerte Proteinkonzentration zurück zu führen ist. Die Variante ToxR'SurAI_L239DF243D (ToxR'SurAI_LF¹) zeigte die stärkste Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch war eine ebenso große Verringerung der Proteinkonzentration im *Western Blot* zu verzeichnen gewesen. Aus diesem Grund konnte bei dieser Variante nicht ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt ausschließlich auf die verminderte Proteinkonzentration zurückzuführen ist.

Die Variante ToxR'SurAI_V263R (ToxR'SurAI_V¹) zeigte bei dem einzigen Test keine Verringerung, sondern sogar einen Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität. Die Variante ToxR'SurAI_M231RV263R (ToxR'SurAI_MV¹) zeigte eine Verringerung der Dimerisierung, jedoch im vergleichbaren Maße wie die Variante ToxR'SurAI_M¹. Daraufhin wurden die Varianten mit der Mutation V263R aus den folgenden Versuchsreihen ausgeschlossen, da diese Position keinen negativen Einfluss auf die Dimerisierungsfähigkeit von SurA zu haben scheint.

4.2.6.2 Analyse der ToxR'SurAI+II-Varianten

Weiterhin wurde die an ToxR fusionierte Kombination der beiden Parvulin-Domänen I und II von SurA (SurAI+II) untersucht. Hierbei wurden die Mutationen M231R (M¹), L239D (L¹) und F243D (F¹) in Parvulin-Domäne I als auch die Mutationen L341D (L²), F349D (F^{2a}) und F353D (F^{2b}) in Parvulin-Domäne II analysiert. Die Varianten ToxR'SurAI+II_M231R (ToxR'SurAI+II_M¹), ToxR'SurAI+II_L239D (ToxR'SurAI+II_L¹) und ToxR'SurAI+II_F243D (ToxR'SurAI+II_F¹) zeigten, wie auch schon bei ToxR'SurAI, eine Verminderung der β -Galaktosidase-Aktivität um fast die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 21b). Bei der Variante ToxR'SurAI+II_M¹ kann dieser Effekt auch vollständig auf die Einführung der Mutation zurückgeführt werden, da auch die Proteinkonzentration im *Western Blot* nahezu unverändert war. Bei den Varianten ToxR'SurAI+II_L¹ und ToxR'SurAI+II_F¹ war die Proteinmenge leicht verringert. Daher kann die beobachtete Verminderung der β -Galaktosidase-Aktivität nicht ausschließlich auf die untersuchten Mutationen zurückgeführt werden.

Im Gegensatz dazu wurde bei den Varianten ToxR'SurAI+II_L341D (ToxR'SurAI+II_L²), ToxR'SurAI+II_F349D (ToxR'SurAI+II_F^{2a}) und ToxR'SurAI+II_F353D (ToxR'SurAI+II_F^{2b}) ein leichter Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität gegenüber ToxR'SurAI+II verzeichnet. Hierbei war die

ERGEBNISSE

Proteinkonzentration von ToxR'SurAI+II_L² um 50 % verringert. Die Einführung der Mutationen F^{2a} und F^{2b} führten nur zu einer geringen Reduktion der Proteinkonzentration.

Im Kontext der fusionierten Parvulin-Domänen von SurA scheinen demnach die ausgewählten Mutationen in der Peptidbindestelle der Parvulin-Domäne I einen messbaren negativen Einfluss auf die Verringerung der Oligomerisierungsfähigkeit der SurA-Variante zu haben. Mutationen der Peptidbindestelle in der Parvulin-Domäne II hingegen scheinen diesen Einfluss nicht zu haben.

4.2.6.3 Analyse der ToxR'SurANCt-Varianten

Nach der Analyse der isolierten Parvulin-Domänen von SurA, folgte die nähere Untersuchung des isolierten Chaperon-Moduls SurANCt. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass dieses ausreichend und notwendig für die *in vivo*-Funktion des SurA-Proteins ist [Behrens *et al.*, 2001].

Untersucht wurden sowohl die Varianten von SurANCt mit Mutationen der in der Kristallstruktur beobachteten Kontakte zwischen den C-terminalen Helices (Positionen M402R (M^C) und D395A (D^C)), als auch mit Mutationen der Kontaktstellen zwischen Helices 3 und 6 (Position H6M3 = Q155A E158A S159A) in der N-terminalen Region von SurA. Obwohl die Proteinmengen der untersuchten Varianten leicht schwankten und teilweise geringer als die der unmutierten Variante ToxR'SurANCt waren, konnte der beobachtete Effekt der eingeführten Mutationen auf die Dimerisierungsfähigkeit nicht nur auf Änderungen der Proteinkonzentration begründet werden (Abb. 21c). Den stärksten Effekt hatte die Mutation ToxR'SurANCt_M402R (ToxR'SurANCt_M^C) im C-Terminus des Chaperon-Moduls. Die Mutation ToxR'SurANCt_D395A (ToxR'SurANCt_D^C) hatte nur einen sehr geringen Effekt auf die Dimerisierungsfähigkeit und konnte den von der Mutation ToxR'SurANCt_M^C beobachteten Effekt nicht weiter verstärken. Die im N-Terminus des Chaperon-Moduls dreifach mutierte Variante ToxR'SurANCt_Q155AE158AS159A (ToxR'SurANCt_H6M3) hatte einen geringeren Effekt als die Einzelmutation ToxR'SurANCt_M^C. Da bei dieser Variante jedoch auch die Proteinkonzentration im vergleichbaren Maß reduziert ist, kann dieser Effekt nicht ausschließlich auf die Mutation H6M3 zurückgeführt werden. Die Kombination der Mutationen im N- und C-Terminus des Chaperon-Moduls in ToxR'SurANCt_H6M3_M^C führte zu einer weiteren Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität fast auf das Niveau der Negativkontrolle ToxR'SurANCt_MalE. Auch in diesem Fall war die Proteinkonzentration der Variante ToxR'SurANCt_H6M3_M^C verringert (~63 %), jedoch nicht im vergleichbaren Maß, wie die Verringerung der Dimerisierungsfähigkeit (~17 %). Die zusätzliche Mutation D395A führte in diesem Fall zu keiner relevanten Veränderung der Oligomerisierungsfähigkeit oder der Proteinkonzentration.

4.2.6.4 Analyse der ToxR'SurANIICt-Varianten

Nach der Untersuchung der isolierten SurA-Domänen wurden im Anschluss Kombinationen von diesen getestet. Zunächst wurde die Variante ToxR'SurANIICt mit den Mutationen L341D (L²), F349D (F^{2a}) und F353D (F^{2b}) in der Parvulin-Domäne II bzw. den Mutationen M402R (M^C) und D395A (D^C) in der C-terminalen Helix, sowie Kombinationen von diesen analysiert (Abb. 21d).

ERGEBNISSE

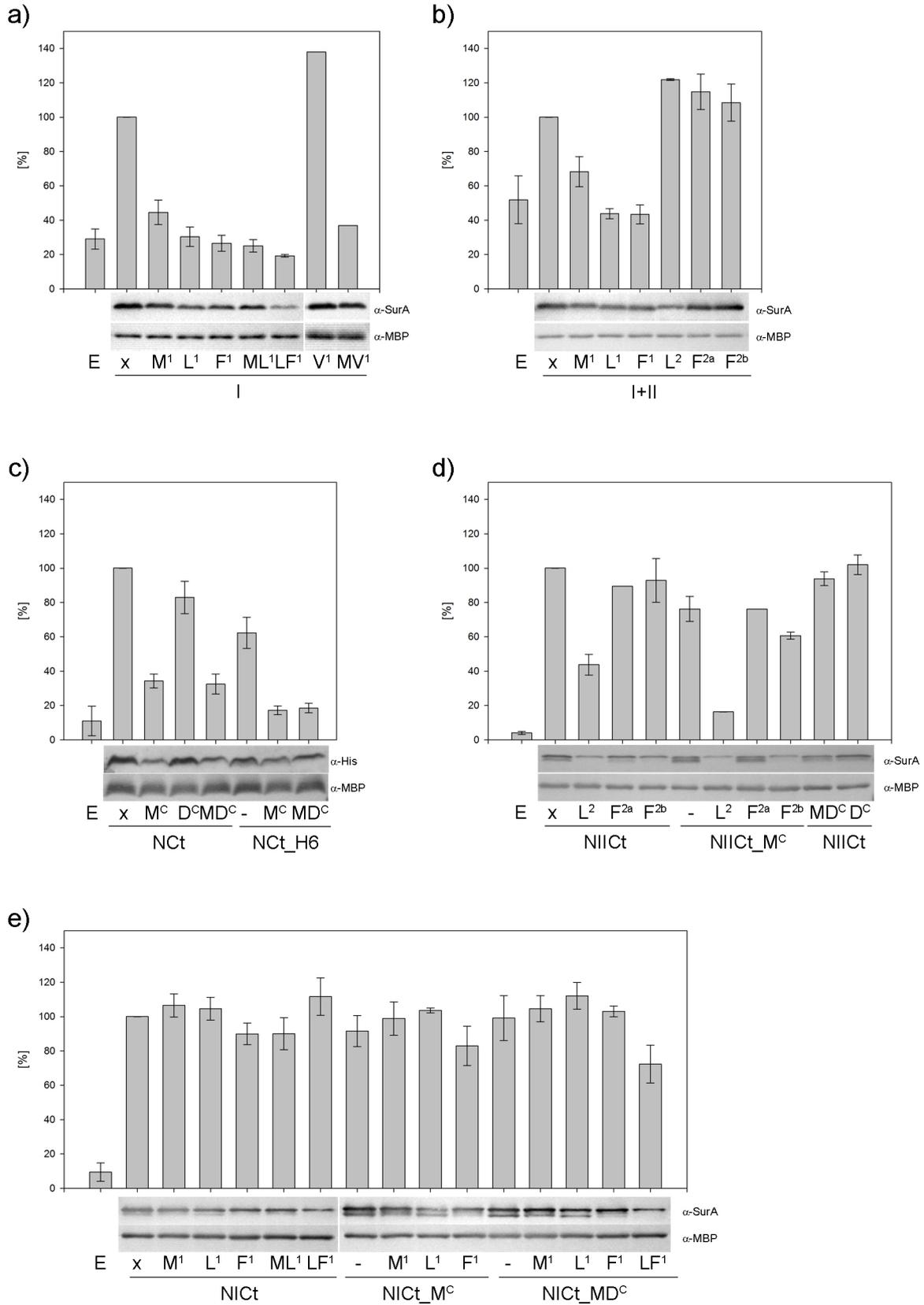


Abb. 21: Analyse der *cpx*-Transkriptionsaktivierung und immunochemischen Detektion von Membran-verankerten ToxR⁺SurA-Fusionsproteinen. Die Aktivität des *cpx*-Promotors wurde durch die Messung der spezifischen β-Galaktosidase-Aktivität ermittelt. Jede Messreihe wurde mit 3 – 5 unabhängigen über Nacht-Kulturen durchgeführt. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden mindestens 2 unabhängige Messreihen verwendet (Ausnahme: SurA: V¹, MV¹, NIICt: F^{2a}, F^{2a}_M^c). Die

ERGEBNISSE

Balken der Diagramme stellen die auf die unmutierten SurA-Varianten normierten Mittelwerte der analysierten Mutanten von **a)** ToxR'SurAI, **b)** ToxR'SurAI+II, **c)** ToxR'SurANICt, **d)** ToxR'SurANIICt und **e)** ToxR'SurANICt dar. Standardabweichungen sind angezeigt. Zusätzlich wurde die Negativkontrolle ToxR'MalE (E) als Referenz für die minimale *cpx*-Promotortranskriptionsaktivierung jeweils auf die unmutierten Varianten normiert. Die ToxR-Fusionsproteine wurden immunochemisch mit spezifischen Antikörpern detektiert. Hierfür wurden 5×10^7 (α -SurA, α -MBP) bzw. 1×10^8 (Tetra α -His) Zellen über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe der entsprechenden Antikörper im *Western Blot* analysiert. Die einzelnen Spuren der *Western Blots* wurden mit der Software Image J quantifiziert. Es wird jeweils ein repräsentativer *Western Blot* unter den Diagrammen angezeigt. Abkürzungen: E = ToxR'MalE (Negativkontrolle); I = ToxR'SurAI; I+II = ToxR'SurAI+II; NCt = ToxR'SurANICt, NIICt = ToxR'SurANIICt, NICt = ToxR'SurANICt, M¹ = M231R; L¹ = L239D; F¹ = F243D; ML¹ = M231R L239D; LF¹ = L239D F243D; V¹ = V263R; MV¹ = M231R V263R; L² = L341D; F^{2a} = F349D; F^{2b} = F353D; M^C = M402R; D^C = D395A; MD^C = M402R D395A; H6 = H6M3 (Q155A E158A S159A)

Insgesamt gestaltete sich die Untersuchung der Varianten ToxR'SurANIICt_L341D (ToxR'SurANIICt_L¹), ToxR'SurANIICt_F349D (ToxR'SurANIICt_F^{2a}), ToxR'SurANIICt_F353D (ToxR'SurANIICt_F^{2b}), ToxR'SurANIICt_M402R_L341D (ToxR'SurANIICt_M^C_L¹) und ToxR'SurANIICt_M402R_F353D (ToxR'SurANIICt_M^C_F^{2b}) als nicht aussagekräftig, da diese Mutationen der Parvulin-Domäne II zu einer relativ starken Verringerung der zellulären Proteinkonzentration führten. Daher sind die beobachteten Effekte dieser Mutationen vermutlich durch eine Destabilisierung des SurANIICt-Proteins zu begründen. Die Variante ToxR'SurANIICt_M402R_F349D (ToxR'SurANIICt_F^{2a}_M^C) zeigte im *Western Blot* eine unveränderte Proteinkonzentration. Es konnte jedoch auch keine weitere Verringerung der β -Galaktosidase-Aktivität gegenüber ToxR'SurANIICt_M^C beobachtet werden.

Für die Variante ToxR'SurANIICt_M402R (ToxR'SurANIICt_M^C) konnte eine Verringerung der β -Galaktosidase-Aktivität gegenüber dem unmutierten Protein beobachtet werden, die nicht durch die Abnahme der Proteinkonzentration erklärt werden kann. Die Mutation D395A führte auch im Kontext von ToxR'SurANIICt zu keiner signifikanten Verminderung der Oligomerisierungsfähigkeit. Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen der Analyse von ToxR'SurANICt.

4.2.6.5 Analyse der ToxR'SurANICt-Varianten

Abschließend wurde noch die Variante SurANICt, der die PPIase-aktive Parvulin-Domäne II fehlt, untersucht. Hierbei wurden die Mutationen M231R (M¹), L239D (L¹), F243D (F¹), M231RL239D (ML¹), L239DF243D (LF¹), teilweise auch in Kombination mit M402R (M^C) bzw. M402RD395A (MD^C) analysiert.

Teilweise wurden bei diesen Versuchen relativ starke Schwankungen der Proteinkonzentration beobachtet, die aber nicht ausschließlich die Begründung für die Veränderungen der β -Galaktosidase-Aktivität liefern können (Abb. 21e). So war bspw. die Proteinkonzentration von ToxR'SurANICt_L239DF243D (ToxR'SurANICt_LF¹) zwar um ca. 50 % vermindert, die β -Galaktosidase-Aktivität aber leicht erhöht. Bei vergleichbar reduzierter Proteinmenge zeigte die Variante ToxR'SurANICt_L239DF243D_M402RD395A (ToxR'SurANICt_LF¹_MD^C) eine deutlich verringerte Oligomerisierung.

Insgesamt konnte nur bei den Varianten ToxR'SurANICt_F243D (ToxR'SurANICt_F¹), ToxR'SurANICt_F243D_M402R (ToxR'SurANICt_F¹_M^C) und ToxR'SurANICt_LF¹_MD^C eine

signifikante Änderung der β -Galaktosidase-Aktivität ermittelt werden. Diese muss aber wohl auf eine im gleichen Maß verringerte Proteinkonzentration zurückgeführt werden.

4.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Untersuchung der Substrat-bzw. Protein-vermittelten Interaktion von mutierten ToxR'SurA-Fusionsproteinen

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses ausgewählter Mutationen in SurA auf die Dimerisierungsfähigkeit im ToxR-Assay, der Detektion der zellulären Proteinkonzentration und der Analyse der *in vivo*-Funktion zur Komplementation eines synthetisch letalen Phänotyps sind in Tab. 31 zusammengefasst. Hierbei wurden einzelne Domänen oder Fragmente von SurA analysiert, um direkte Aussagen über den Effekt einzelner Mutationen vor dem Hintergrund des komplexen Interaktionsnetzwerks innerhalb des SurA-Gesamtproteins treffen zu können.

Die absoluten Werte der β -Galaktosidase-Aktivität schwankten in den ToxR-Assays. Die Tendenzen waren jedoch vergleichbar und so wurden für den Vergleich der ToxR'SurA-Varianten die relativen Werte herangezogen. Hierbei wurde die unmutierte SurA-Variante jeweils als 100 % festgelegt und die Werte der mutierten SurA-Varianten in Relation dazu gesetzt. Die auf diese Weise errechneten Werte sind in der Tabelle mit „ToxR“ markiert.

Zusätzlich wurden die Fusionsproteine hingehend ihrer Konzentration in den Zellen analysiert. Hierzu wurden Aliquots aus den 5 parallelen Ansätzen vereinigt und die darin enthaltenen Proteine im *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern detektiert. Um eine genauere Aussage über die Bandenintensität der detektierten Proteine zu geben, wurden die *Western Blots* mit der Software Image J quantifiziert. Um auch hier eine Vergleichbarkeit der ermittelten Proteinkonzentrationen zu ermöglichen, wurden die berechneten Proteinkonzentrationen auf die geladene Menge Protein der Ladekontrolle MalE normiert. Die erhaltenen Werte können der Tabelle in den mit „WB“ markierten Zeilen entnommen werden.

Des Weiteren wurde die Komplementierung der *in vivo*-Funktion in einem Tropftest untersucht. Hierbei wurde die Fähigkeit zur Komplementationsfähigkeit des synthetisch letalen Phänotyps des untersuchten *E. coli*-Stammes der mutierten Varianten mit den unmutierten Varianten verglichen. Auch diese Ergebnisse sind in der Tabelle unter der Bezeichnung „Spot“ zusammengefasst.

Die Mutationen im Bereich der Peptidbindestelle in der Parvulin-Domäne I (M231R = M¹, L239D = L¹ und F243D = F¹) haben zu einer Verringerung der Oligomerisierungsfähigkeit der Fusionsproteine im Kontext der isolierten Parvulin-Domäne I und der kombinierten Parvulin-Domänen I+II geführt. Es konnte jedoch kein signifikanter Effekt bei der Mutation dieser Positionen in SurANICt nachgewiesen werden. Vergleichbar stellen sich Ergebnisse der kombinierten Mutation LF¹ dar. Die Mutation V¹ führte in keiner der untersuchten Varianten zu einer negativen Reduktion der Dimerisierungsfähigkeit. Aus diesem Grund wurde diese Variante auch nicht weiter untersucht.

Die Mutation M402R (M^c) im C-Terminus von SurA führt im Kontext der Varianten SurANcT und SurANIICt zu einer signifikanten Reduktion der Dimerisierungsfähigkeit. Diese konnte jedoch nicht für die Variante SurANICt nachgewiesen werden.

ERGEBNISSE

Tab. 31: Zusammenfassung der Daten aus den ToxR'SurA basierten Experimenten. ToxR: Mittelwert der *cpx*-Transkriptionsaktivierung aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 – 5 Messwerten und zugehörige Standardabweichungen (Ausnahme: SurAI: V¹, MV¹, NIICt: F^{2a}, F^{2a}_M^C) Western Blot (WB): Mittelwert der relativen Proteinbandenintensität im Western Blot aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen und zugehörige Standardabweichung (Ausnahme: SurAI: V¹, MV¹, NIICt: F^{2a}, F^{2a}_M^C). Die ToxR'SurA-Fusionsproteine wurden immunochemisch detektiert und die Proteinbandenintensitäten mit Hilfe der Software Image J quantifiziert. Die SurA-Banden wurden gegen die MBP-Ladekontrolle normiert. Die Bandenintensitäten der unmutierten SurA-Varianten wurden auf 100 % festgesetzt und die Bandenintensität der mutierten Varianten gegen die jeweilige unmutierte SurA-Variante relativiert. Spot: Komplementierung der *in vivo*-Funktion im Komplementationstest (+++ = vollständige Komplementierung, entspricht den unmutierten SurA-Varianten, ++ bzw. + = teilweise Komplementierung; - = keine Komplementierung) Abkürzungen: I = ToxR'SurAI; I+II = ToxR'SurAI+II; Nct = ToxR'SurANct, NIICt = ToxR'SurANIICt, NICt = ToxR'SurANICt, M¹ = M231R; L¹ = L239D; F¹ = F243D; ML¹ = M231R L239D; LF¹ = L239D F243D; V¹ = V263R; MV¹ = M231R V263R; L² = L341D; F^{2a} = F349D; F^{2b} = F353D; M^C = M402R; D^C = D395A; MD^C = M402R D395A; H6 = H6M3 (Q155A E158A S159A); n.g. = nicht getestet

ToxR'SurA-Variante	Test	Mutationen in N- und C-Terminus							
		M ^C	D ^C	MD ^C		H6	H6_MD ^C	H6_M ^C	
Nct	ToxR	34,3 ± 4,0	82,9 ± 9,4	32,5 ± 5,8		62,4 ± 9,1	18,5 ± 2,8	17,2 ± 2,6	
	WB	82,1 ± 42,9	92,6 ± 10,3	57,7 ± 13,5		77,8 ± 19,4	56,5 ± 6,4	63,6 ± 1,4	
	Spot	+++	+++	+++		+++	++	+++	
NIICt	ToxR	76,2 ± 7,3	102,0 ± 5,7	93,8 ± 4,0		n.g.	n.g.	n.g.	
	WB	93,3 ± 16,6	91,4 ± 3,7	71,8 ± 20,9		n.g.	n.g.	n.g.	
	Spot	++	++	+		n.g.	n.g.	n.g.	
NICt	ToxR	91,6 ± 9,0	n.g.	99,2 ± 13,1		n.g.	n.g.	n.g.	
	WB	109,9 ± 10,5	n.g.	154,2 ± 12,7		n.g.	n.g.	n.g.	
	Spot	++	n.g.	+(+)		n.g.	n.g.	n.g.	
		Mutationen in Domäne I							
		M ¹	L ¹	F ¹	V ¹		ML ¹	MV ¹	LF ¹
I	ToxR	44,6 ± 7,1	30,3 ± 5,7	26,5 ± 4,7	137,9		25,0 ± 3,6	36,9	19,3 ± 0,8
	WB	71,7 ± 7,8	55,4 ± 1,2	55,5 ± 1,1	93,0		48,6 ± 7,7	60,0	20,9 ± 3,9
I+II	ToxR	68,3 ± 8,8	43,8 ± 3,0	43,4 ± 5,5	n.g.		n.g.	n.g.	n.g.
	WB	92,2 ± 13,3	65,9 ± 19,3	75,3 ± 9,5	n.g.		n.g.	n.g.	n.g.
NICt	ToxR	106,5 ± 6,7	104,6 ± 6,7	90,0 ± 6,3	114,6 ± 5,8		90,0 ± 9,4	112,5 ± 9,9	111,6 ± 10,9
	WB	90,9 ± 5,8	86,1 ± 2,8	65,7 ± 7,8	129,4		71,9 ± 9,0	133,4	51,2 ± 3,0
	Spot	+++	+++	+++	+++		+++	++	+++
		Mutationen in Domäne I und C-Terminus							
		M ¹ _M ^C	L ¹ _M ^C	F ¹ _M ^C	M ¹ _MD ^C	L ¹ _MD ^C	F ¹ _MD ^C	LF ¹ _MD ^C	V ¹ _MD ^C
NICt	ToxR	98,9 ± 9,7	103,6 ± 1,4	82,9 ± 11,4	104,6 ± 7,6	112,1 ± 7,8	103,0 ± 3,1	72,3 ± 3,1	99,3 ± 3,1
	WB	104,9 ± 12,9	92,6 ± 21,6	85,1 ± 20,2	133,6 ± 18,0	110,0 ± 15,3	92,5 ± 17,5	52,3 ± 14,4	n.g.
	Spot	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
		Mutationen in Domäne II und C-Terminus							
		L ²	F ^{2a}	F ^{2b}		L ² _M ^C	F ^{2a} _M ^C	F ^{2b} _M ^C	
I+II	ToxR	121,8 ± 0,5	114,8 ± 10,3	108,4 ± 10,8		n.g.	n.g.	n.g.	
	WB	50,8 ± 11,6	81,4 ± 18,5	80,4 ± 17,8		n.g.	n.g.	n.g.	
NIICt	ToxR	43,8 ± 6,0	89,4	92,8 ± 12,7		16,3 ± 0,02	76,1	60,7 ± 2,0	
	WB	39,83 ± 9,7	74,0	37,9 ± 14,3		22,6 ± 5,1	88,0	37,5 ± 9,1	
	Spot	+++	++	++		++	++	++	

Die ebenfalls im C-Terminus lokalisierte Mutation D395A (D^C) zeigte allein oder in Kombination mit der Mutation M^C in keiner der untersuchten Varianten eine signifikante Reduktion der Oligomerisierungsfähigkeit.

Bemerkenswert ist jedoch der Verlust der *in vivo*-Funktion der Varianten SurANICt_MD^C und SurANIICt_MD^C. Dieser Funktionsverlust ist jedoch nur in Anwesenheit einer der beiden Parvulin-Domänen zu beobachten. Im Kontext des Chaperon-Moduls führt die kombinierte Mutation MD^C nicht zu diesem Verlust der *in vivo*-Funktion.

Bei der Kombination der Mutationen der Parvulin-Domäne I und des C-Terminus im Kontext von SurANICt konnte eine Verringerung der Oligomerisierungsfähigkeit beobachtet werden. Da die Proteinkonzentrationen dieser Varianten jedoch im vergleichbaren Maß reduziert waren, konnte dieser Effekt nicht ausschließlich auf die eingeführten Mutationen zurückgeführt werden.

Die drei-fach Mutation H6M3 wurde in dieser Arbeit nur im Kontext des isolierten Chaperon-Moduls SurANcT untersucht. Die hierbei beobachtete Reduktion der Dimerisierungsfähigkeit wurde von einer gleichermaßen verringerten Proteinkonzentration begleitet. So konnte auch hier kein eindeutiger Effekt dieser Kombinationsmutation gezeigt werden.

Die Reduktion der Dimerisierungsfähigkeit durch Mutationen in der Parvulin-Domäne II von SurA (L341D = L²; F349D = F^{2a} und F353D = F^{2b}) kann nicht ausschließlich auf die analysierten Mutationen zurückgeführt werden, da diese Varianten durchgehend leicht bis stark verminderte Proteinkonzentrationen aufweisen (bis zu lediglich 22 %). Aus diesem Grund waren die in diesen Kombinationen durchgeführten Versuche nicht adäquat auswertbar.

4.3 Grundlagen zur Methodik der ortsspezifischen Quervernetzung von Peptiden bzw. Proteinen an das periplasmatische Chaperon SurA

In dieser Arbeit wurden für die ESR- und Fluoreszenzspektroskopischen Versuche (Kap. 4.1) kurze Peptide mit einer Länge von 12 -14 Aminosäuren für die Bindung an SurA verwendet. Bei diesen Versuchen konnte jedoch nicht für alle Peptide, die als SurA-bindende Peptide identifiziert worden waren [Hennecke *et al.*, 2005b; Hennecke, 2006], eine Interaktion mit der Parvulin-Domäne I des SurA-Proteins nachgewiesen werden. Eine direkte Interaktion mit der Parvulin-Domäne I von SurA wurde für das Peptid Pep46 nachgewiesen. Basierend auf dieser Erkenntnis stellte sich dann die Frage, wo und in welcher Weise längere Peptide innerhalb des SurA-Proteins binden.

Die bisher in der Arbeitsgruppe verwendeten relativ kurzen, löslichen Peptide der Porine LamB und OmpF [Hennecke, 2006] und wurden über chemische Synthese hergestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide lagen schon in der Arbeitsgruppe vor. Aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften war die Synthese einiger Peptide schwierig bzw. nicht möglich, so dass diese Methode für die Synthese längerer Peptide nicht in Betracht kam. Daher sollten die längeren Peptide *in vitro* in einem kombinierten Transkriptions-Translations-Ansatz in Anwesenheit von SurA synthetisiert und im Anschluss mittels ortsspezifischer Quervernetzung kovalent an das SurA-Protein gebunden werden, um ihre potentiellen Interaktionsbereiche in SurA zu detektieren. Bei dieser Methode werden die Peptide über die

ortsspezifisch in das SurA-Protein integrierte, photoaktivierbare, unnatürliche Aminosäure *para*-Benzoylphenylalanin (*p*BPA) [Kauer *et al.*, 1986; Dorman and Prestwich, 1994] kovalent mit SurA quervernetzt. Die hieraus entstehenden Protein-Peptid-Interaktionskomplexe können nach Auftrennung im SDS-PAGE mittels *Western Blot* oder alternativ mittels Autoradiographie detektiert werden, sofern die Peptide bei ihrer Synthese durch den Einbau einer radioaktiven Aminosäure markiert wurden.

Zur Durchführung dieser Arbeiten wurden verschiedene Vektoren und Stämme benötigt, deren Generierung im Folgenden beschrieben wird.

4.3.1 Generierung der Vektoren und des Proteinexpressionsstammes für die Versuche der ortsspezifischen Quervernetzung

Für die Durchführung der Quervernetzungsversuche wurden zwei Arten von Plasmiden benötigt: einerseits Vektoren, die für LamB-Polypeptide und das LamB-Protein kodieren, und andererseits Vektoren, welche für die Produktion von *p*BPA-enthaltenden SurA-Proteinen benötigt werden. Da sich während der ersten Versuche herausgestellt hat, dass die vorhandenen Proteinproduktionsstämme nicht für die Produktion von SurA-*p*BPA-Proteinen geeignet sind, wurde auch ein neuer Proteinproduktionsstamm benötigt und generiert.

4.3.1.1 Auswahl der LamB-Peptide

In den ESR- und Fluoreszenzspektroskopischen Versuchen konnte für das LamB-Peptid Pep46 eine Bindung an die Parvulin-Domäne I von SurA nachgewiesen werden (Kap. 4.1). Aus diesem Grund sollte dieses Peptid als Ausgangspunkt für die nachfolgenden Versuche verwendet werden.

Die zu verwendenden LamB-Fragmente sollten somit die Pep46-Sequenz enthalten und lang genug sein, um ausgehend von einer Bindung in der Parvulin-Domäne I von SurA bis in das Chaperon-Modul SurANcT zu reichen, damit man dort gegebenenfalls eine Quervernetzung mit der dort eingeführten künstlichen Aminosäure *p*BPA erhält. Die Abstände von SurAI zum Chaperon-Modul SurANcT betragen 25 – 40 Å und der Spalt innerhalb des Core-Moduls SurANcT hat eine Länge von ~50 Å [Bitto and McKay, 2003]. LamB ist ein Porin der äußeren Membran von *E. coli* und besteht aus 18 antiparallelen β -Strängen [Schirmer *et al.*, 1995; Dutzler *et al.*, 1996] und Peptide mit 7 Aminosäuren in β -Strang Konformation besitzen eine Länge von ca. 20 Å [Bitto and McKay, 2003]. Ausgehend von der Annahme, dass auch Fragmente des LamB-Proteins wahrscheinlich weitestgehend eine β -Strang Konformation aufweisen werden, wurden Fragmente von 36 bzw. 59 Aminosäuren Länge ausgewählt, damit diese den Spalt des Chaperon-Moduls komplett durchspannen könnten. Auf dieser Basis wurden ausgehend von der Pep46-Sequenz in LamB (rot, Abb. 22) die Peptide Pep46-L (Pep46 mit einer einseitigen Verlängerung des Peptides in C-terminale Richtung, kurz PL) und L-Pep46-L (Pep46 mit beidseitiger Verlängerung des Peptides in C- und N-terminaler Richtung, kurz LPL) festgelegt. Die *Primer* für die Amplifikation der entsprechenden Sequenzabschnitte durch PCR wurden anhand der LamB-Gensequenz im Leseraster ausgewählt. Durch die gleichzeitige Einführung einer *SacI*- Restriktionssite *upstream* und einer *PstI*-Restriktionssite *downstream* wurde die nachfolgende Klonierung der Fragmente erleichtert.

MMITLRKLPLAVAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEQQCFQTTGAQSKYRLGNECE
TYAELKLGQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGNLIEWLPGSTIWAG
KRFYQRH **DVHMIDFYWDIS** GPGAGLENIDVGFGLSLAATRSSEAGGSSSFASNNIYDYTNET
ANDVFDVRLAQMEINPGGTLELGVVDYGRANLRDNYRLVDGASKDGWLF TAEHTQSVLKGFNKFV
VQYATDSMTSQGKLSQSGVAFDNEKFAYNINNNHMLRILDHGAI SMGDNDMMYVGMQDI
NWDNDNGTKWWTVGIRPMYKWTPI MSTVMEIGYDNVESQRTGDKNNQYKITLAQQWQAGDSIWS
RPAIRVFATYAKWDEKWGYDYTG NADNNANFGKAVPADFN GGSFGRGDSDEWTFGAQMEIWW

Abb. 22: Lage und Aminosäuresequenz der LamB-Polypeptide innerhalb der LamB-Proteinsequenz. Die LamB-Polypeptide wurden ausgehend von der Sequenz des Peptides Pep46 (DVHMIDFYWDIS, rot markiert) innerhalb der Gesamtsequenz von LamB ausgewählt. Das Peptid Pep46-L besitzt eine einseitige Verlängerung der Sequenz in C-terminaler Richtung (PL, gelb hinterlegt) und das Peptid L-Pep46-L besitzt Verlängerungen in N- und C-terminale-Richtung (LPL, blau hinterlegt). Die Signalsequenz des LamB-Proteins ist grün markiert.

4.3.1.2 Generierung der OMP-Polypeptid-kodierenden Vektoren pQE-PLStrep und pQE-LPLStrep

Quervernetzte Komplexe der SurA-Proteine mit den LamB-Fragmenten sollten später leicht und eindeutig identifiziert werden können, indem sowohl das SurA-Protein, als auch das LamB-Fragment unabhängig voneinander im *Western Blot* nachgewiesen werden können.

SurA lässt sich im *Western Blot* mit SurA- und mit His-tag-Antikörpern nachweisen, da die in den Versuchen verwendeten SurA-Varianten über einen C-terminalen His-tag verfügen. Diese zusätzliche Detektionsmöglichkeit ist notwendig, da der in der Arbeitsgruppe verwendete SurA-Antikörper lediglich SurA-Fragmente detektiert, die auch mindestens eine der beiden Parvulin-Domänen enthalten. Die isolierte Chaperondomäne SurANcT kann daher nur über den C-terminalen His-tag detektiert werden.

Der Nachweis des LamB-Proteins gestaltete sich schwieriger, da in der Arbeitsgruppe kein geeigneter Antikörper gegen LamB vorhanden war. Aus diesem Grund sollten die LamB-Fragmente und das LamB-Protein mit einem Strep-tag versehen werden. Um die entsprechenden Vektoren zu generieren, wurde zunächst ein 79 bp Fragment mit der *multiple cloning site* und dem Strep-tag II (WSHPQFEK) durch *SacI* und *HindIII* aus dem Vektor pASKMalEStrep (eigene Arbeitsgruppe) herausgeschnitten. Durch Spaltung mit den gleichen Enzymen wurde der Vektor pQESurASac linearisiert und dabei das *surA*-Gen und die Sequenz des His-tags entfernt. Lediglich die Sequenz für das SurA-Signalpeptid blieb erhalten. Auf diese Weise könnten die LamB-Peptide gegebenenfalls auch für *in vivo*-Versuche im Periplasma produziert werden. Durch Klonierung des 79 bp Fragments in den linearisierten pQE-Vektor wurde der Vektor pQEStrep erhalten, der über das SurA-Signalpeptid, eine *multiple cloning site* und einen Strep-tag verfügte. Dieser Vektor wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Aus dem das *lamB*-Gen enthaltenden Vektor pPER99 [Rouviere and Gross, 1996] wurden die Fragmente PL (*Primer* Pep46_Sacfor_new und Pep46_LPst_rev_new), sowie LPL (*Primer* L_Pep46Sac_for und P46_LPst_rev_new) mit Fragmentgrößen von 140 bp bzw. 200 bp amplifiziert. Die gereinigten Fragmente wurden zunächst in den Vektor pCR®2.1-TOPO ligiert. Die Fragment-Insertion wurde mittels Kolonie-PCR mit den PCR-Primern und die erfolgreiche Einführung der neuen Restriktionsschnittstellen für *SacI/PstI* mittels Testspaltungen überprüft. Nach Verifizierung der Plasmide durch Sequenzierung wurden die Vektoren pTOPO-PL#4 und pTOPO-LPL#2 erhalten. Die *lamB*-Genfragmente wurden

ERGEBNISSE

anschließend durch *SacI/PstI*-Spaltung in den Vektor pQESTrep umkloniert. Nach erfolgreicher Testspaltung mit *NcoI* und *HindIII* wurden die Vektoren pQE-PLStrep#5 und pQE-LPLStrep#6.2 mittels Sequenzierung als positiv bestätigt.

Die oben beschriebenen Plasmide wurden generiert, da zunächst das in der Arbeitsgruppe bereits etablierte EcoPro™ T7 System (Merck, Cat. No. 70876; vormals Novagen) zur *in vitro* Transkription/Translation verwendet werden sollte, welches effizient Proteine *downstream* sowohl von *E. coli*- als auch von T7-Promotoren synthetisiert. Zwischenzeitlich war die Produktion dieses Kits jedoch eingestellt worden. Als Alternative wurde das zellfreie System PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit der Firma NEB (Cat. No. E6800S) ausgewählt. Dieses Kit bietet den Vorteil gegenüber zellbasierten Kits, dass in seiner definierten Zusammensetzung kein SurA vorhanden ist [Shimizu *et al.*, 2005]. So sind spätere Reaktionen mit bereits im Extrakt vorhandenem SurA ausgeschlossen. Mit diesem Kit ist es zusätzlich möglich, *in vitro* neu-synthetisierte Proteine durch Affinitätschromatographie von den Bestandteilen des Kits zu trennen, da diese Faktoren alle über einen His-tag verfügen [Shimizu *et al.*, 2005]. Dieses System der zellfreien *in vitro* Transkription/Translation wurde bereits erfolgreich für Quervernetzungs-Reaktionen mit pBPA-markiertem Trigger Faktor benutzt [Lakshmiathy *et al.*, 2007].

4.3.1.3 Generierung der Vektoren pTOPO-PLStrep, pTOPO-LPLStrep und pTOPO-LamB

Für das PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit werden Vektoren benötigt, in denen die zu exprimierenden Gene unter Kontrolle des T7-Promotors stehen. Daher wurden die für das EcoPro™ T7 System generierten pQE-Vektoren als Ausgangspunkt genommen, um die gewünschten Sequenzen in den Vektor pCR®2.1-TOPO umzuklonieren.

Der in der Arbeitsgruppe vorhandene Vektor pTOPO-TolC SD7 wurde durch *EcoRI* und *HindIII* linearisiert (~ 3000 bp) und mit den *EcoRI/HindIII*-Fragmenten aus pQE-PLStrep (270 bp), pQE-LPLStrep (340 bp) bzw. pPER99 (1420 bp) ligiert. Zur Überprüfung der erhaltenen Klone wurde eine Kolonie-PCR mit den Primern M13U und M13R durchgeführt. Durch Sequenzierung wurden die Vektoren pTOPO-PLStrep#12, pTOPO-LPLStrep#4 und pTOPO-LamB#2 verifiziert.

In ersten Versuchen mit den Vektoren pTOPO-PLStrep, pTOPO-LPLStrep und pTOPO-LamB im PURExpress-Kit ließen sich im *Western Blot* mit dem Strep-tag-Antikörper keine Produkte nachweisen (*data not shown*). Hingegen war von den Plasmiden pTOPO-PLStrep und pTOPO-LPLStrep in *E. coli* generiertes Produkt mittels *Western Blot* mit dem Strep-tag-Antikörper in Zellrohextrakten nachweisbar (Abb. 23a). Daher wurde angenommen, dass die im *in vitro*-System erhaltene Konzentration der relativ kleinen Fragmente für die Detektion mittels *Western Blots* zu gering ist. Daher wurde die Analyse zunächst mittels Autoradiographie unter radioaktiver Markierung mit ³⁵S-Methionin (Hartmann Analytics) durchgeführt.

4.3.1.4 Autoradiographie von *in vitro* synthetisiertem LamB-Protein

Da die kleinen LamB-Fragmente PLStrep bzw. LPLStrep generell schwieriger nachzuweisen sind, als größere Protein-Fragmente bzw. Gesamtproteine, wurde zunächst ein Test mit dem LamB-kodierenden Vektor pTOPO-LamB, sowie dem YaeT-kodierenden Vektor pTOPO-YaeT unter Zugabe von ³⁵S-

ERGEBNISSE

Methionin durchgeführt. LamB und YaeT sind beides β -Fassartige Proteine der äußeren Membran von *E. coli*. LamB hat in seiner denaturierten monomeren Form eine Größe von ca. 47 kDa. YaeT wurde hier zusätzlich analysiert, da dieses integrale Außenmembranprotein mit ~ 90 kDa relativ groß ist und aufgrund der daraus resultierenden größeren Anzahl an Methionin-Resten leichter zu detektieren sein sollte. Für das PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB) wird eine Plasmidkonzentration von 250 ng/Reaktionsansatz empfohlen. Um die beste Plasmidkonzentration für die maximale Proteinausbeute zu erhalten, wurde der Vektor pTOPO-LamB in aufsteigenden Plasmidkonzentrationen von 50 ng bis 1 μ g pro Versuchsansatz in einer Versuchsreihe eingesetzt.

Die Ansätze wurden wie unter 3.2.8 beschrieben, zusammen gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mit einer 12,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend wie unter 3.4.3 beschrieben weiter behandelt. Das *Imaging Plate* wurde abschließend in einem BasReader (FLA-2000) abgescannt und die Bilder mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer gespeichert.

Wie in Abb. 23b zu sehen, erhält man mit 250 – 500 ng eingesetzten Plasmid die maximale Proteinmenge an LamB. Dies wird durch weitere Plasmidzugabe nicht weiter gesteigert. Generell konnten mit den Vektoren pTOPO-LamB und pTOPO-YaeT jedoch nur relativ geringe Mengen an Protein detektiert werden. Ein Grund könnte sein, dass der Vektor pCR®2.1-TOPO (Invitrogen) keine T7-Terminator-Sequenz besitzt und es dadurch zu Kapazitätsverlusten kommen kann. Nach Rücksprache mit der Firma NEB wurden weitere Versuche mit verschiedenen PCR-Produkten und *run off*-T-Transkripten durchgeführt. Diese führten jedoch zu keinem zufrieden stellenden Ergebnis.

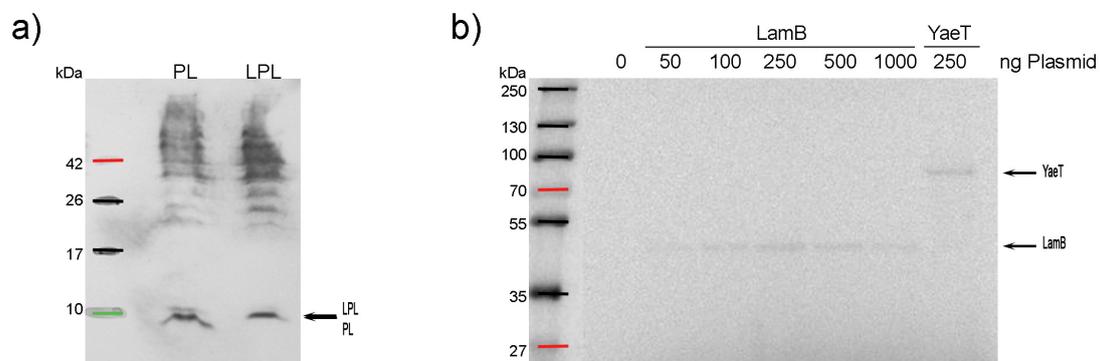


Abb. 23: Detektion der LamB-Fragmente PL und LPL, sowie des LamB-Proteins. a) Immunodetektion der längeren LamB-Peptide PL und LPL. Die Peptide wurden in *E. coli* produziert und die Rohextrakte im Western Blot mit Strep-tag-Antikörpern analysiert. Hierbei konnten die Peptide erwartungsgemäß im Bereich der 10 kDa-Bande nachgewiesen werden. Im oberen Bereich des *Western Blots* sind noch weitere unspezifische Banden zu sehen, bei denen es sich vermutlich um Kreuzreaktionen handelt. **b)** Titration der Plasmidmenge von pTOPO-LamB zur Erhaltung der maximalen Ausbeute des Proteinproduktes im PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB) und autoradiographische Detektion. Als Kontrollvektor wurde pTOPO-YaeT analysiert, da das resultierende YaeT-Protein relativ groß ist und über eine große Anzahl an Methioninresten verfügt, die bei der Autoradiographie detektiert werden. Die größte Menge an LamB-Protein erhält man mit einer eingesetzten Plasmidkonzentration von 250 – 500 ng/Reaktionsansatz. Generell ist die erhaltene Proteinausbeute jedoch relativ gering.

4.3.1.5 Generierung der Vektoren pEXP5-CT/PLStrep, pEXP5-CT/LPLStrep und pEXP5-CT/LamB

Um die Proteinausbeute weiter zu optimieren, wurde eine weitere Umklonierung der Genfragmente in den pEXP5-CT/TOPO®-Vektor der Firma Invitrogen vorgenommen. Dieser optimierte Klonierungsvektor wird im Zusammenhang mit dem Expressway Mini Cell-Free *E. coli* Expression System angeboten (Invitrogen, pEXP5-CT/TOPO®, #V960-06). Dieser T7-basierte Vektor ermöglicht laut Hersteller die schnelle, direkte Insertion von mit *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Fragmenten und die anschließende Expression von rekombinanten Proteinen in Zell-freien Systemen oder in *E. coli* (Invitrogen, Benutzerhandbuch pEXP5-CT/TOPO® TA Expression Kits, #V960-06).

Alternativ kann man mittlerweile auch das DHFR-Kontrollplasmid aus dem modifizierten PURExpress-Kit als Klonierungsvektor einsetzen, da dieser die erforderliche Zusammensetzung für eine maximale Proteinausbeute besitzt und darüber hinaus über eine *multiple cloning site* verfügt (NEB, #E6800S). Zum Zeitpunkt der Versuche stand diese Variante noch nicht zur Verfügung und die DNA-Sequenzen der LamB-abgeleiteten Fragmente Pep46-LStrep (PL) und L-Pep46-LStrep (LPL), sowie von Vollängen-LamB wurden in den pEXP5-CT/TOPO®-Vektor integriert.

Die Gene für die LamB-Fragmente PLStrep (218 bp) und LPLStrep (284 bp) wurden mit den Primern YMLamB1 und YMLamB2 aus den Plasmiden pTOPO-PLStrep#12 bzw. pTOPO-LPLStrep#4 amplifiziert. Das *lamB*-Gen wurde mit den Primern YMLamB3 und YMLamB4 aus dem Vektor pTOPO-LamB#2 amplifiziert. Die gereinigten Fragmente wurden direkt in den Vektor pEXP5-CT/TOPO® ligiert. Nach Kolonie-PCR mit den Primern LamB1 und T7TermRev für die Amplifikation der Fragmente PL (364 bp) bzw. LPL (430 bp), sowie mit den Primern LamB3 und T7TermRev für das LamB-Fragment (1491 bp) wurden die Vektoren pEXP5-CT/PLStrep#1, pEXP5-CT/LPLStrep#4 und pEXP5-CT/LamB#2 zusätzlich durch Sequenzierung bestätigt und für die weiteren Versuche eingesetzt.

4.3.2 *In vitro* Transkription/Translation von LamB-Polypeptiden und des LamB-Proteins

Die Plasmide pEXP5-CT/PLStrep#1, pEXP5-CT/LPLStrep#4 und pEXP5-CT/LamB#2 wurden in zwei parallelen Versuchsreihen bezüglich der Produktion und Detektionsmöglichkeit der produzierten Lam-Proteine bzw. -Fragmente untersucht. Für die erste Versuchsreihe wurden jeweils 250 ng der Vektoren pEXP5-CT/PLStrep#1 bzw. pEXP5-CT/LPLStrep#4 in den Versuchsansatz des PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB) gegeben und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Produkte wurden dann mittels eines 10 – 20 % SDS-Gradientengels (Biorad) aufgetrennt. Dieses wurde anschließend durch Bindung des Strep-tag-Antikörpers im *Western Blot* immunochemisch analysiert (Abb 24a).

In diesem Versuch wurde gezeigt, dass die längeren LamB-Polypeptide PL und LPL in ausreichenden Mengen produziert und im *Western Blot* durch den Strep-tag-Antikörper detektiert werden können. Im Vergleich zu der vorangegangenen Produktion dieser Peptide und der Analyse des Rohextraktes (Abb. 23a), sind in diesem *Western Blot* auch keine unerwünschten Kreuzreaktionen des Antikörpers zu detektieren gewesen.

ERGEBNISSE

In der zweiten Versuchsreihe wurden die Ansätze ebenfalls mit jeweils 250 ng der Plasmide pEXP5-CT/PLStrep#1, pEXP5-CT/LPLStrep#4 bzw. pEXP5-CT/LamB#2 versetzt. Zusätzlich wurde den Versuchsansätzen vor der 4-stündigen Inkubation bei 37°C noch ³⁵S-Methionin (Hartmann Analytics) zugefügt. Die erhaltenen Produkte wurden ebenfalls mittels eines 10 – 20 % SDS-Gradientengels (Biorad) aufgetrennt. Die autoradiographische Detektion und Analyse erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Hierbei wurde das LamB-Protein in ausreichenden Mengen für eine Detektion in der Autoradiographie produziert (Abb. 24b). Die LamB-Fragmente PL und LPL wurden in wesentlich geringerem Maße detektiert. Dies ist vermutlich auf die sehr geringe Menge an Methionin-Resten innerhalb dieser Peptid-Sequenzen zurückzuführen.

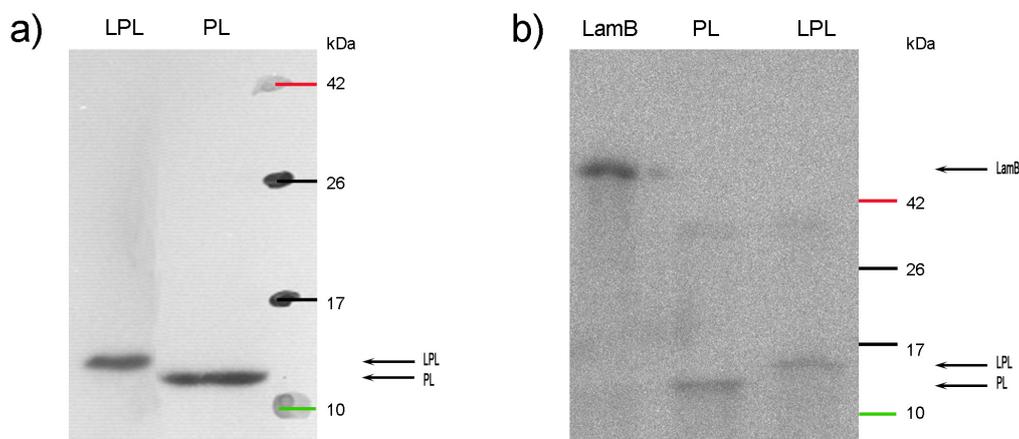


Abb. 24: Nachweis der LamB-Polypeptide PL und LPL und des LamB-Proteins. a) Western Blot der *in vitro* produzierten LamB-Polypeptide PL und LPL. Die Peptide wurden mittels des PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB) hergestellt, in einem 10 – 20 % SDS-Gradientengel (Biorad) aufgetrennt und anschließend mit Strep-tag-Antikörpern detektiert. Die längeren LamB-Peptide PL und LPL wurden erfolgreich und ohne Kontaminationen nachgewiesen. **b)** Autoradiographie der *in vitro* produzierten LamB-Polypeptide PL und LPL und des LamB-Proteins. Das LamB-Protein wurde in ausreichenden Mengen produziert und konnte deutlich nachgewiesen werden. Die LamB-Peptide PL und LPL konnten aufgrund ihres geringen Methioninanteils nur sehr schwach detektiert werden. Aus diesem Grund wurde präferiert, PL und LPL im Western Blot mit Strep-tag-Antikörpern zu detektieren.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass von den Vektoren pEXP5-CT/PLStrep#1, pEXP5-CT/LPLStrep#4 bzw. pEXP5-CT/LamB#2 die gewünschten Peptide bzw. das LamB-Protein in ausreichenden Mengen mit dem PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB) produziert werden können. Hierbei stellte sich heraus, dass die LamB-Fragmente PL und LPL auch im Western Blot mit Strep-tag-Antikörpern nachgewiesen werden können und eine Detektion unter radioaktiven Bedingungen nicht notwendig ist. Aufgrund des Fehlens eines adäquaten LamB-Antikörpers kann das LamB-Gesamtprotein momentan lediglich mittels Autoradiographie mit einer spezifischen Bande nachgewiesen werden.

4.3.3 Produktion von SurA- bzw. SurAI-*p*BPA-Proteinen für die gezielte ortsspezifische Quervernetzung von Peptiden bzw. Proteinen

4.3.3.1 Generierung der Plasmide für die Produktion von SurA-*p*BPA-Varianten

Die ortsspezifische Quervernetzung der LamB-Peptide PL und LPL, sowie des LamB-Proteins an SurA sollte über die unnatürliche Aminosäure *p*BPA [Kauer *et al.*, 1986] geschehen. *p*BPA ist ein sehr effizienter Photocrosslinker, der eine selektive Interaktion zwischen dem Benzophenon und benachbarten Aminosäuren herstellt [Keutmann and Rubin, 1993]. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (350 – 360 nm) wird *p*BPA aktiviert und reagiert mit unreaktiven C-H-Bindungen [Dorman and Prestwich, 1994]. Die Insertion von *p*BPA in ein Protein erfolgt durch den Vektor pEVOL-*p*BpF, welcher für ein orthogonales Aminoacyl-tRNA-Synthetase/Suppressor tRNA-Paar kodiert, welches *p*BPA spezifisch an der Stelle des *amber*-Nonsenscodons integriert [Young *et al.*, 2010].

Als Positionen für die Integration von *p*BPA wurden Positionen in der Parvulin-Domäne I und im Chaperon-Modul von SurA (SurAI bzw. SurANcT) ausgewählt. In SurAI wurden die Positionen M231 und L239 ausgewählt (Abb. 25), da diese Bestandteil der postulierten Substratbindestelle sind [Xu *et al.*, 2007].

Da in den ESR-Versuchen das Peptid Pep46, welches die Basis für die längeren LamB-Peptide ist, in diesem Bereich gebunden hat, sind Positionen im Bereich der postulierten Substratbindestelle wahrscheinlich relativ gut geeignet, um eine Quervernetzung des längeren LamB-Peptides mit dem SurA-Protein zu erhalten. Für die Position M231 ist jedoch zu beachten, dass die Mutation M231R zu einem signifikanten Verlust der Bindungsfähigkeit des Peptides Pep46 an die Parvulin-Domäne I geführt hat. Dennoch sollte eine Quervernetzung mit dieser Position versucht werden, da diese optimal in der Substratbindestelle lokalisiert ist.

In früheren publizierten Arbeiten wurde vermutet, dass die Substratbindestelle sich in einem Spalt innerhalb der Kerndomäne befindet [Bitto and McKay, 2002]. Dieser Bereich ist nach Bindung eines artifiziellen Peptides an Domäne I in der Kristallstruktur relativ frei zugänglich [Xu *et al.*, 2007]. Basierend auf diesen Erkenntnissen und auf Daten aus der Arbeitsgruppe wurden die Positionen Y128 und E135 als aussichtsreiche Kandidaten für eine Quervernetzung der längeren LamB-Peptide angesehen (Abb. 25). Zusätzlich wurde die Position K86 als potentielle Negativkontrolle ausgewählt, da diese sich an der Unterseite des Chaperon-Moduls von SurA befindet (Abb. 25) und daher eine Quervernetzung mit den längeren Peptiden als eher unwahrscheinlich angesehen wurde.

Für die Einführung des *amber*-Nonsenscodons TAG an die gewünschte Position innerhalb des *surA*-Gens wurden *Primer* definiert, die an Stelle des jeweiligen zu ersetzenden Aminosäure-Triplets das *amber*-Nonsenscodon TAG trugen. Mit einer *quick change mutagenesis* PCR (QC-PCR) wurden in den Vektor pASKcSurAI die Mutationen M231_{TAG} und L239_{TAG} und in den Vektor pASKSurA die Mutationen K86_{TAG}, Y128_{TAG}, E135_{TAG}, M231_{TAG} und L239_{TAG} eingeführt. Nach *DpnI*-Verdau wurden die so erhaltenen Plasmide in *E. coli* transformiert, die Plasmide präpariert und die erfolgreiche Einführung des *amber*-Nonsenscodons TAG an die gewünschte Position per Sequenzierung überprüft. Die Vektoren

ERGEBNISSE

pASKcSurAI_M231_{amber}#5, pASKcSurAI_L239_{amber}#2, pASKSurA_K86_{amber}#1,
pASKSurA_Y128_{amber}#2, pASKSurA_E135_{amber}#2, pASKSurA_M231_{amber}#1 und
pASKSurA_L239_{amber}#2 wurden als positiv bestätigt und somit für die weiteren Versuche eingesetzt.

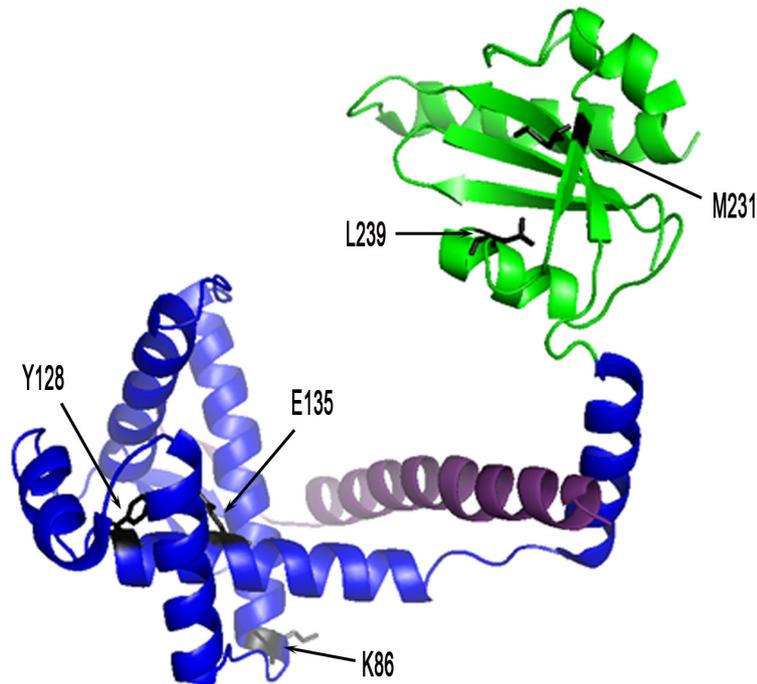


Abb. 25: Position der zur Insertion der unnatürlichen Aminosäure ρ BPA ausgewählten Aminosäurereste in SurANCT. Die postulierte Bindestelle liegt innerhalb der Parvulin-Domäne I von SurA (grün). Dargestellt ist eine Untereinheit des SurANCT-Dimers modifiziert nach [Xu *et al.*, 2007] (PDB ID: 2PV3; Parvulin-Domäne I (SurAI): grün; N-Terminus: blau; C-Terminus: lila). Die Aminosäurereste M231 und L239 liegen in direkter räumlicher Nähe zur postulierten Substratbindestelle in SurAI. Basierend auf dem Lamb-Peptid Pep46 wurden längere Peptide *in vitro* produziert, die anschließend an SurA gebunden werden sollen. Bei Bindung des Peptides Pep46 an die Parvulin-Domäne I von SurA wurden für den weiteren Verlauf der C- bzw. N-terminalen Verlängerungen des Peptides die Positionen E135 und Y128 im N-Terminus des SurA-Proteins als aussichtsreiche Interaktionspartner angenommen. Als Negativkontrolle wurde die Position K86 auf der diesen Positionen gegenüberliegenden Seite des SurANCT-Moduls ausgewählt. Die markierten Positionen wurden für die Insertion der unnatürlichen Aminosäure ρ BPA ausgewählt.

4.3.3.2 Generierung eines *surA*-defizienten Protein-Produktionsstammes

Der in den vorherigen Versuchen für die Proteinexpression verwendete Stamm YM10105 besitzt eine Chloramphenicol-Resistenz (Cm^R) und konnte daher für die Produktion der ρ BPA-enthaltenden SurA-Varianten nicht benutzt werden, da das für die Einführung der unnatürlichen Aminosäure ρ BPA notwendige Plasmid pEVOL- ρ BpF ebenfalls eine Chloramphenicol-Resistenz besitzt. Der alternativ in der Arbeitsgruppe vorhandene *surA*-defiziente Stamm SB44567 besitzt eine Kanamycin-Resistenz (Km^R), konnte jedoch ebenfalls nicht zur Proteinproduktion und -reinigung mittels Nickel-basierter IMAC genutzt werden. Bei Expression in diesem Stamm, kam es bei der IMAC zur persistierenden parallelen Reinigung eines etwa 20 kDa großen Proteins (*data not shown*). Dabei handelte es sich vermutlich um die cytoplasmatische FKBP-PPIase SlyD, die eine Größe von 21 kDa hat [Hottenrott *et al.*, 1997]. SlyD ist eine häufige Kontamination bei Proteinproduktionen, da es über eine Histidin-reiche Region verfügt

[Kasher *et al.*, 1993; Hottenrott *et al.*, 1997; Parsy *et al.*, 2007]. Dies geschieht vor Allem bei der Nickel-basierten IMAC, da SlyD eine hohe Affinität für Nickel-Ionen besitzt [Wulfiging *et al.*, 1994]. Durch Verwendung eines Kobalt-basierten Trägermaterials ließe sich diese Kontamination vermutlich vermeiden [Bush *et al.*, 1991]. Um jedoch bei dem in der Arbeitsgruppe etablierten Nickel-basierten Proteinreinigungssystem zu bleiben, wurde ein neuer *surA*-defizienter Produktionsstamm durch homologe Rekombination [Datsenko and Wanner, 2000] im *slyD*-negativen Hintergrund des Stammes SB44097 generiert.

Die homologe Rekombination wurde wie unter 3.2.7 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurde das *surA*-Gen gegen das Konstrukt *surA::km* ausgetauscht. Die Einführung der Kanamycin-Resistenz wurde durch das Ausstreichen auf einer Kanamycin-haltigen Agarplatte bestätigt. Die Deletion des *surA*-Gens wurde mittels *Western Blot* mit dem SurA-Antikörper und per PCR-Analyse nachgewiesen. Der auf diese Weise neu-generierte Stamm YM10219 wurde für die Produktion der SurA-*pBPA*-Proteine eingesetzt.

4.3.4 Analyse der *in vivo*-Funktion der *pBPA*-haltigen SurA-Proteine

Vor dem Einsatz der neu-generierten Vektoren zur Expression von *pBPA*-haltigen Proteinen im präparativen Maßstab, wurden diese zunächst in einem Tropftest hinsichtlich ihrer Funktionalität analysiert. Die Lebensfähigkeit des konditional letalen Stammes SB44452 (Laborsammlung) und die Komplementierbarkeit seiner Letalität durch Plasmid-kodierte SurA-Proteine wurden hierbei untersucht. Die in diesem Komplementationstest zu analysierenden Vektoren besitzen alle ein *amber*-Nonsenscodon innerhalb des *surA*-Gens. Dieses sollte nur in Anwesenheit des für das orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetase/Suppressor-tRNA-Paar-kodierenden Vektors *pEVOL-pBpF* [Young *et al.*, 2010] überlesen werden und so zu einem vollständigen SurA-Protein führen. An die Stelle des *amber*-Nonsenscodon wird hierbei die unnatürliche Aminosäure *pBPA* in das Protein integriert.

Die zu testenden Plasmide wurden frisch in den Stamm SB44452 transformiert. Die Transformanten wurden über Nacht in IPTG-haltigem Selektionsmedium angezogen und von den Kulturen Verdünnungsstufen von 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} und 10^{-7} hergestellt. Diese wurden auf Selektionsplatten, sowohl mit und ohne den Induktor IPTG (1 mM) bzw. Arabinose (0,2 %), als auch mit und ohne *pBPA* (0,2 mM) aufgetropft. Die Inkubation der Komplementationstests erfolgte über Nacht bei 37°C. Als Kontrollen dienten jeweils der Leervektor *pASK75*, der den synthetisch letalen Phänotypen nicht komplementieren kann, und das SurA-Wildtyp kodierende Plasmid *pASKSurA*, welches stets in der Lage zur vollständigen Komplementation ist. Mittels dieses Komplementationstest wurden nur die *pASKSurAamber*-Varianten untersucht. Denn dieser Test ist für die SurAI-Varianten nicht möglich ist, da diese nicht über das Chaperon-Modul SurANcT verfügen, welches jedoch für die Komplementation des synthetisch letalen Phänotyps notwendig ist [Behrens *et al.*]. Es wurde gezeigt, dass das Plasmid *pEVOL-pBpF* alleine den synthetisch letalen Phänotypen nicht komplementieren kann (Abb. 26a).

Ohne Zugabe von *pBPA* und dem für die Insertion notwendigen Plasmid *pEVOL-pBpF* kann keine der SurA*amber*-Varianten den letalen Phänotypen von SB44452 komplementieren (Abb. 26b). Dies zeigt, dass das *amber*-Nonsenscodon nicht überlesen wird und somit keine vollständigen SurA-Proteine hergestellt

ERGEBNISSE

werden können. Bei Addition von *pBPA* und *pEVOL-pBpF* zeigten alle *SurAamber*-Varianten Funktionalität, da sie, unabhängig vom Induktor Arabinose, in gleichem Maße wachsen wie die Zellen, die das *SurA*-Wildtypplasmid enthalten (Abb. 26c). Die Induktion der Produktion des Aminoacyl-tRNA-Synthetase/Suppressor-tRNA-Paares von *pEVOL-pBpF* erfolgt durch die Zugabe des Induktors Arabinose [Young *et al.*, 2010].

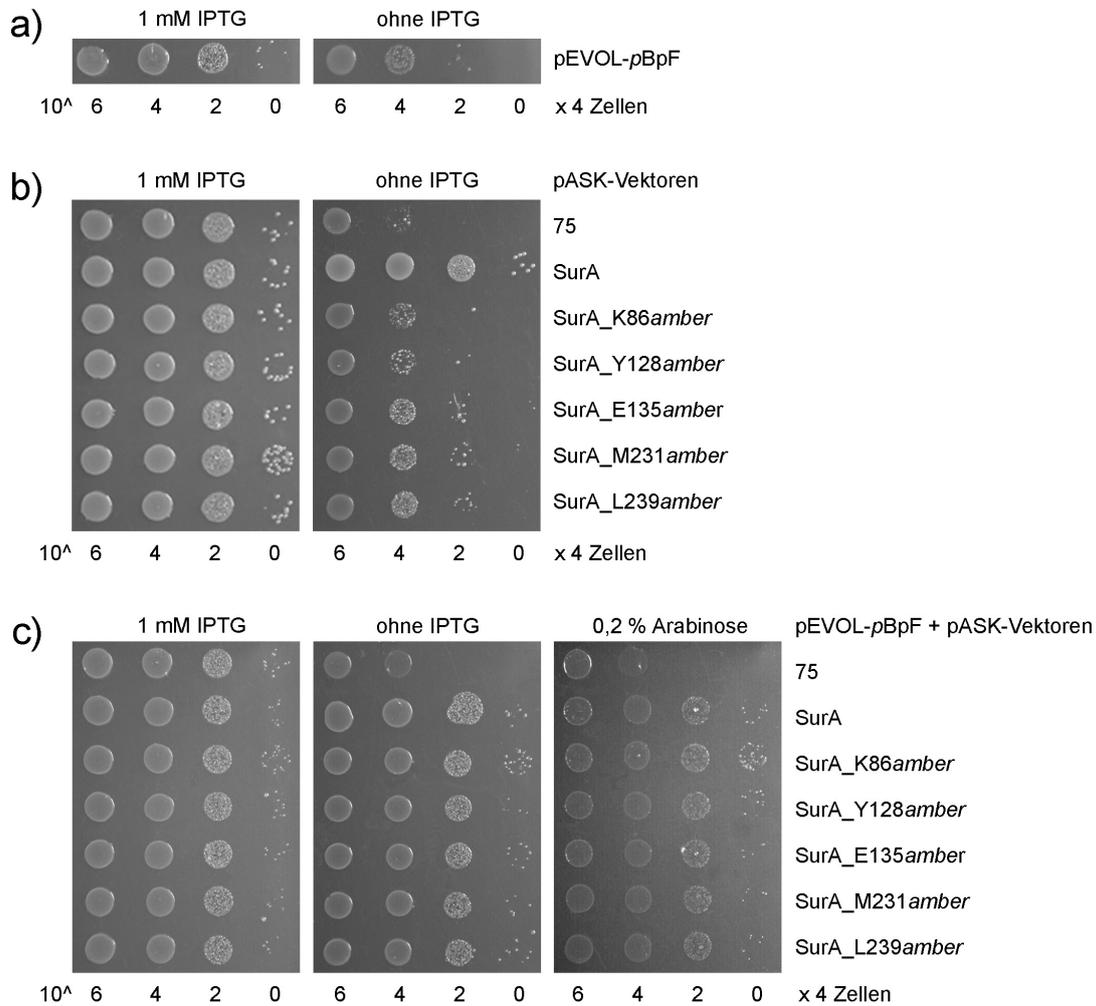


Abb. 26: Komplementierung des konditional letalen Phänotyps des Stammes *P_{Lac-O1-surA} Δskp* (SB44452) durch *SurApBPA*-Proteine. Untersucht wurde das Wachstum des *SurA*-Depletionsstammes SB44452 in Anwesenheit von *SurAamber*-Plasmiden. Die zu untersuchenden Kulturen wurden über Nacht in IPTG-haltigem Medium angezogen und ausgehend von einer OD₆₀₀ von 4,0 wurden Verdünnungsstufen von 10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁵ und 10⁻⁷ Zellen/ml hergestellt. Von diesen wurden jeweils gleiche Volumina auf LB-Platten mit Spec Km Cm (a), Spec Km Ap (b) bzw. Spec Km Ap Cm (c) aufgetropft und bei 37°C für 16 – 24 h inkubiert. **a)** Das Plasmid *pEVOL-pBpF* besitzt nicht die Funktion den synthetisch letalen Phänotypen des Stammes SB44452 zu komplementieren. **b)** Gezeigt ist die Analyse der Komplementation der *pASKSurAamber*-Plasmide in Abwesenheit des Plasmides *pEVOL-pBpF*. Ohne Zugabe dieses Plasmides kann die unnatürliche Aminosäure *pBPA* nicht an Stelle des *amber*-Nonsenscodons in das *SurA*-Protein eingebaut werden. **c)** Bei zusätzlicher Anwesenheit des Plasmides *pEVOL-pBpF* wird der Wachstumsdefekt des Depletionsstammes komplementiert. Die Induktion der Produktion des Aminoacyl-tRNA-Synthetase/Suppressor-tRNA-Paares von *pEVOL-pBpF* durch Zugabe des Induktors Arabinose ist hierfür nicht erforderlich.

4.3.5 Expression von SurAI- bzw. SurA-*pBPA*-Proteinen

Für die Produktion von *pBPA*-haltigen Proteinen ist neben dem für das Zielprotein kodierenden Vektor ein zusätzliches Plasmid für die Integration von *pBPA* notwendig. Der Vektor pEVOL-*pBpF* enthält ein orthogonales Aminoacyl-tRNA-Synthetase/Suppressor-tRNA-Paar, welches die unnatürliche, photoreaktive Aminosäure *pBPA* in die Aminosäurekette integriert [Chin *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2010]. Zur Produktion der *pBPA*-haltigen Proteine wurde der zuvor generierte Stamm YM10219 verwendet (Kap. 4.3.3.2).

4.3.5.1 Testproduktion der *pBPA*-haltigen SurA-Proteine im neu-generierten Proteinproduktionsstamm YM10219

Für die Etablierung der Methode zur Produktion der *pBPA* enthaltenden Proteine wird empfohlen, die Expression zunächst im kleinen Maßstab zu testen [Farrell *et al.*, 2005]. Hierfür wurde der Stamm YM10219 jeweils mit den Plasmiden pASK75 (Leervektor), pASKcSurAI, pASKcSurAI_M231*amber*, pASKcSurAI_L239*amber*, pASKSurA, pASKSurA_K86*amber*, pASKSurA_Y128*amber*, pASKSurA_E135*amber*, pASKSurA_M231*amber* bzw. pASKSurA_L239*amber* und ggf. zusätzlich mit dem Vektor pEVOL-*pBpF* transformiert. Einen Überblick über die Zusammensetzung der einzelnen Testproduktionen gibt Tab. 32.

Tab. 32: Zusammensetzung der Kulturen für die Testproduktion von SurAI- bzw. SurA-*pBPA*-Proteinen. Diese Tabelle fasst die Zusammensetzung der Testproduktionen, die in Abb. 27 dargestellt sind, zusammen. Die Probenbezeichnung bezieht sich hierbei auf die Kurzbenennung innerhalb der Abbildung. Die Zugabe von *pBPA* bzw. des Induktors Arabinose ist mit einem „+“ gekennzeichnet.

Probenbezeichnung	Stamm	Plasmid(e)	Antibiotika	<i>pBPA</i>	Induktor Arabinose
				1 mM	0,2%
In Abb. 27a:					
75	YM10219	pASK75	Km Ap	-	+
S	YM10219	pASKSurA	Km Ap	-	+
L	YM10219	pASKSurA_L239 <i>amber</i>	Km Ap	-	+
Lp	YM10219	pASKSurA_L239 <i>amber</i> pEVOL-BpF	Km Ap Cm	-	+
Lp	YM10219	pASKSurA_L239 <i>amber</i> pEVOL-BpF	Km Ap Cm	+	-
Lp	YM10219	pASKSurA_L239 <i>amber</i> pEVOL-BpF	Km Ap Cm	+	+
Kp	YM10219	pASKSurA_K86 <i>amber</i> pEVOL-BpF	Km Ap Cm	+	+
Yp	YM10219	pASKSurA_Y128 <i>amber</i> pEVOL-BpF	Km Ap Cm	+	+
Ep	YM10219	pASKSurA_E135 <i>amber</i> pEVOL-BpF	Km Ap Cm	+	+
Mp	YM10219	pASKSurA_M231 <i>amber</i> pEVOL-BpF	Km Ap Cm	+	+
In Abb. 27b:					
S1	YM10219	pASKSurAI	Km Ap	-	+
L	YM10219	pASKSurAI_L239 <i>amber</i>	Km Ap	-	+
Lp	YM10219	pASKSurAI_L239 <i>amber</i> pEVOL-BpF	Km Ap Cm	-	+
Lp	YM10219	pASKSurAI_L239 <i>amber</i> pEVOL-BpF	Km Ap Cm	+	-
Lp	YM10219	pASKSurAI_L239 <i>amber</i> pEVOL-BpF	Km Ap Cm	+	+
Mp	YM10219	pASKSurAI_M231 <i>amber</i> pEVOL-BpF	Km Ap Cm	+	+

ERGEBNISSE

Von einer über Nacht-Kultur wurden 200 µl abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 10000 Upm, 10 min), vom Zentrifugat 160 µl Medium abgenommen und das Pellet im zurückbleibenden Volumen Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in 37°C vorgewärmte 100 ml-Kolben mit 40 ml LB-Medium mit Antibiotika und ggf. 1 mM *p*BPA gegeben (siehe Tab. 32). Hierbei ist zu beachten, das *p*BPA nur in vorgewärmtes Medium zu geben und dieses umgehend zu schwenken ist, da *p*BPA sonst ausfällt und nur noch sehr schwer löslich ist. In diesem Zustand kann ein ordnungsgemäßer Einbau in das Zielprotein dann nicht mehr gewährleistet werden (eigene Beobachtungen und [Farrell *et al.*, 2005]).

Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Proteinproduktion, wenn erforderlich, durch Zugabe von 0,2 % Arabinose induziert. Die Proteinproduktion erfolgte über Nacht bei 30°C (Schüttelinkubator, 200 Upm). Aliquots der erhaltenen Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 5,0 eingestellt und jeweils 10 µl im *Western Blot* mit SurA-spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 27).

Es konnte gezeigt werden, dass die *amber*-Varianten ohne die Zugabe des Plasmides pEVOL-*p*BpF und der unnatürlichen Aminosäure *p*BPA nicht in der Lage sind, Protein zu produzieren. Ist nur der Vektor pEVOL-*p*BpF vorhanden, wird eine relativ kleine Menge der *amber*-Proteine produziert. Diese Hintergrund-Produktion tritt vermutlich auf, wenn die Suppressor-tRNA an Stelle von *p*BPA eine der natürlich vorkommenden Aminosäuren, die strukturell ähnlich zu *p*BPA sind, wie Phenylalanin oder Tyrosin, einbaut. In der Massenspektrometrie wurde gezeigt, dass dieser Vorgang in Anwesenheit der spezifischen Aminosäure unterdrückt wird [Young *et al.*, 2010]. In Gegenwart von *p*BPA und pEVOL-*p*BpF werden unabhängig von der Arabinose-Induktion zu SurAI- bzw. SurA-Wildtyp vergleichbare Mengen an Protein detektiert.

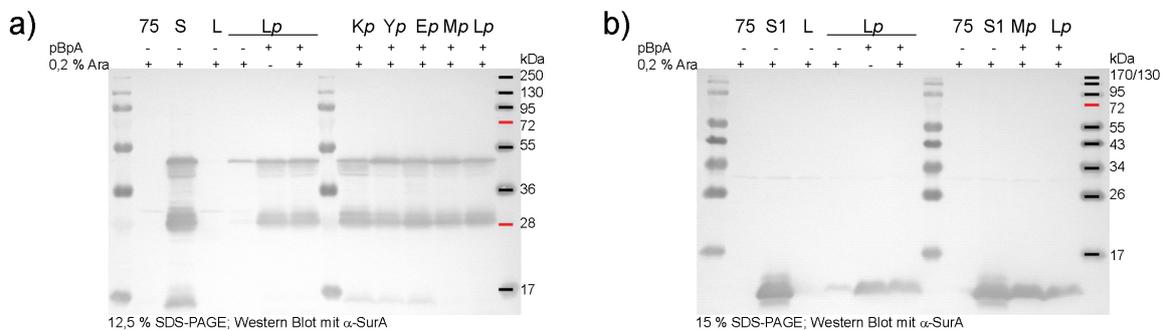


Abb. 27: Testproduktion der *p*BPA-haltigen SurA- bzw. SurAI-Proteine. Gezeigt sind die *Western Blots* der a) SurA- und der b) SurAI-Proteine. Die Zusammensetzung der Ansätze für die Testproduktion und die Erklärung der Abkürzungen kann Tab. 16 entnommen werden. Vorgewärmtes LB-Medium wurde in den angegebenen Zusammensetzungen angesetzt und bei 37°C schwenkend inkubiert. Die Proteinproduktion erfolgte in Ab- und Anwesenheit („-“ bzw. „+“ in Tab. 16) des Induktors Arabinose bei einer OD₆₀₀ von 0,6. Im Anschluss erfolgte die schwenkende Proteinproduktion bei 30°C über Nacht. Aliquots der Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 5,0 eingestellt und gleiche Volumina im *Western Blot* mit SurA-spezifischen Antikörpern analysiert. Ohne die Zugabe von pEVOL-*p*BpF und *p*BPA wird kein Protein produziert. Ist nur der Vektor pEVOL-*p*BpF, aber kein *p*BPA vorhanden, so kommt es zu einer geringen Hintergrundproduktion. In Anwesenheit des Vektors pEVOL-*p*BpF erfolgt die Produktion der SurA- bzw. der SurAI-*p*BPA-Proteine unabhängig von der Zugabe des Induktors Arabinose. Bei den SurA-Varianten sind bei der Protein-Produktion über Nacht relativ viele Abbauprodukte zu sehen. Diese werden bei der Reinigung über IMAC im großen Maßstab jedoch nicht von der Säule gebunden und eluiert.

ERGEBNISSE

Bei den SurA-Varianten sind bei der Protein-Produktion über Nacht relativ viele Abbauprodukte zu sehen. Diese werden bei der weiteren Reinigung über IMAC jedoch nicht von der Säule gebunden und eluiert (siehe Kap. 4.3.5.2).

Bei der Proteinproduktion für die ESR-Spektroskopie erfolgte die Produktion für ca. 4 h, um eine zufriedenstellende Proteinmenge zu erhalten. Diese Zeit zeigte sich für die Produktion der ρ BPA-enthaltenden Proteine jedoch nicht als ausreichend. Daher wurde diese lange Induktionsphase beibehalten, um die Proteinausbeute zu maximieren.

4.3.5.2 Produktion der SurA- ρ BPA-Proteine im präparativen Maßstab

Die ρ BPA-haltigen SurA- bzw. SurAI-Proteine wurden im kleinen Maßstab erfolgreich im Expressionsstamm YM10219 produziert (siehe 4.3.5.1). Bei dieser Testproduktion wurde lediglich mit 0,2 % Arabinose induziert und eine im Western Blot nachweisbare Menge an SurA- bzw. SurAI-Proteinen erhalten. Bei den ersten Versuchen im präparativen Maßstab wurde jedoch durch die alleinige Induktion mit Arabinose nur eine relativ geringe Menge an Protein erhalten, die für die weiter geplanten Versuche nicht ausreichen würde. Daher wurden weitere Versuche durchgeführt, um die Proteinproduktion weiter zu optimieren und die Proteinausbeute zu maximieren.

Hierzu wurden zwei parallele Ansätze zur Produktion der Variante SurA_Y128- ρ BPA durchgeführt (Abb. 28). Im ersten Ansatz wurde nur mit 0,2 % Arabinose und im zweiten mit 0,2 % Arabinose in Kombination mit 10 μ g/ml Tetrazyklin induziert. Hierbei ist Arabinose der Induktor für den Vektor pEVOL- ρ BpF und Tetrazyklin induziert die Proteinexpression der pASK-Vektor-basierten SurA-Proteine.

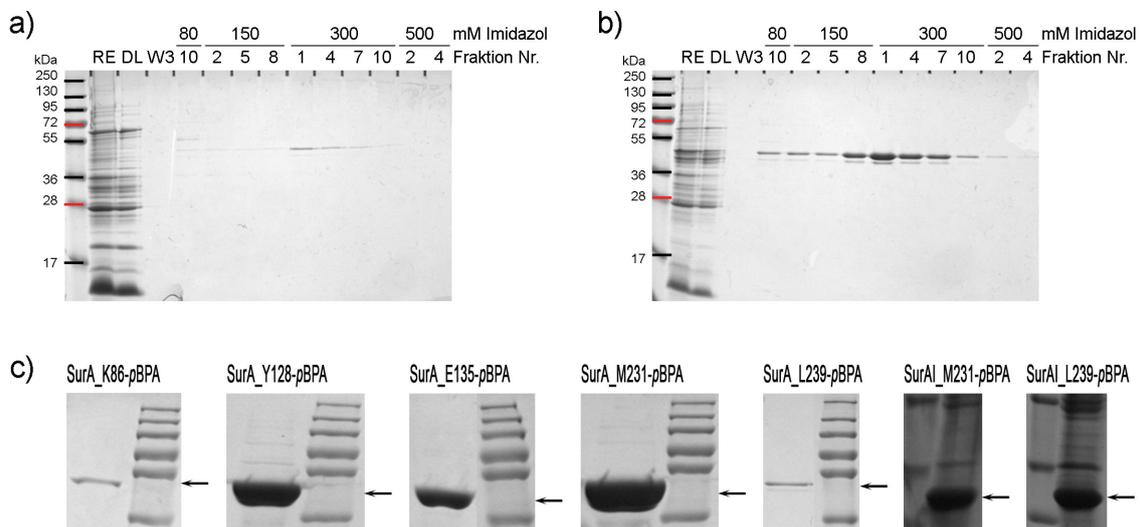


Abb. 28: Vergleichende Proteinproduktion von SurA_Y128- ρ BPA und Analyse der Proteinproduktion der ρ BPA-Proteine. Die Produktion des Proteins SurA_Y128- ρ BPA wurde in parallelen Ansätzen unter Zugabe (a) des Induktors Arabinose bzw. (b) der Induktoren Arabinose und Tetrazyklin analysiert. Für die Proteinproduktion im präparativen Maßstab ist die Zugabe von beiden Induktoren notwendig, um eine ausreichende Proteinmenge zu erhalten. c) Gezeigt ist die Auftrennung der konzentrierten Proteinprodukte der ρ BPA-Proteine im Coomassie-gefärbten SDS-Gel. Es wurden auch die Proteine SurA_K86- ρ BPA, SurA_E135- ρ BPA, SurA_M231- ρ BPA, SurA_L239- ρ BPA, sowie SurAI_M231- ρ BPA und SurAI_L239- ρ BPA erfolgreich und in ausreichenden Mengen für die weiteren Versuche produziert.

ERGEBNISSE

Nach der Affinitätschromatographischen Aufreinigung und der Analyse in der SDS-PAGE konnte bei dem Ansatz, der mit beiden Induktoren behandelt worden ist, eine wesentlich höhere Ausbeute an Protein erzielt werden (Abb. 28b), als bei dem Ansatz, der nur mit Arabinose induziert worden war (Abb. 28 a). Im Folgenden wurden daher zur Proteinproduktion grundsätzlich beide Induktoren eingesetzt.

Die *p*BPA-haltigen Proteine wurden, wie oben beschrieben produziert und aus dem Periplasma (SurA-Varianten) bzw. aus dem Cytoplasma (SurAI-Varianten) gereinigt. Die Proteine SurA_K86-*p*BPA, SurA_Y128-*p*BPA, SurA_E135-*p*BPA, SurA_M231-*p*BPA, SurA_L239-*p*BPA, sowie SurAI_M231-*p*BPA und SurAI_L239-*p*BPA konnten erfolgreich produziert und über Nickel-basierte IMAC gereinigt werden. Für die erste Analyse der Produktions wurden die *p*BPA-Proteine einkonzentriert und im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 28c).

Im Rahmen dieser Arbeit war es somit möglich, die Produktion aller *p*BPA-haltigen SurA- bzw. SurAI-Proteine im analytischen sowie im präparativen Maßstab erfolgreich durchzuführen und die Proteine affinitätschromatographisch zu reinigen.

Somit konnten die entscheidenden Grundlagen für die zukünftigen Studien zur Analyse der Interaktion von SurA mit seinen biologisch relevanten Substraten gelegt werden.

5 Diskussion

5.1 Analyse der Interaktion von Peptiden mit MTSSL-markierten SurA-Cys- bzw. SurAI-Cys-Proteinen mittels ESR-Spektroskopie

Das periplasmatische SurA-Protein besteht aus zwei Parvulin-ähnlichen Domänen (SurAI und SurAII), einer knapp ein Drittel des Gesamtproteins umfassenden amino-terminalen, sowie einer kurzen carboxy-terminalen Region [Bitto and McKay, 2002]. Die beiden letztgenannten Regionen bilden hierbei das Chaperon-Modul (SurANcT), welches ausreichend ist, um eine *surA*-Mutante zu komplementieren [Behrens *et al.*, 2001]. Vorangegangene Studien zur Substratspezifität von SurA haben gezeigt, dass spezifische Muster aromatischer Aminosäuren und die Orientierung ihrer Seitenketten zur selektiven Erkennung von Peptiden an das SurA-Protein beitragen [Hennecke, 2006]. Die Annahme, die Substratbindestelle befände sich in einem Spalt zwischen dem N- und C-terminalen Bereich von SurA [Bitto and McKay, 2002, 2003], konnte bisher nicht bestätigt werden. Studien zur Peptidbindung innerhalb des Chaperon-Moduls SurANcT waren aufgrund von Instabilität und Aggregation des Proteins nicht erfolgreich [Xu *et al.*, 2007]. In proteinkristallographischen Strukturen konnte jedoch die Bindung des artifiziellen Peptides PepC an das SurA-Protein ohne Parvulin-Domäne II nachgewiesen und eine Bindestelle für dieses Peptid in der PPIase-aktiven Parvulin-Domäne I identifiziert werden [Xu *et al.*, 2007]. Basierend auf diesen strukturellen Daten wurden Positionen innerhalb des SurA-Proteins für die weitere Analyse mittels ESR-Spektroskopie ausgewählt.

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Peptiden handelt es sich einerseits um Peptide aus der LamB- bzw. OmpF-Peptid-Bibliothek [Hennecke, 2006] und andererseits um das artifizielle Peptid PepC [Xu *et al.*, 2007]. Die LamB- bzw. OmpF-Peptide waren in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurden in Substratspezifitätsstudien als starke Binder (Pep46, Pep54, Pep95) bzw. als Nicht-Binder (Pep71) von SurA identifiziert [Hennecke, 2006]. Sie weisen in der Vorhersage weitgehend eine β -Strang-Struktur auf. Als Positivkontrolle wurde das α -helikale, artifizielle Peptid PepC [Xu *et al.*, 2007] verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels ESR-Spektroskopie und Fluoreszenzspektroskopie untersucht, ob auch natürliche Peptidsubstrate von SurA mit der PepC-Peptidbindestelle interagieren und ob eventuell noch weitere Peptidbindestellen für diese Peptide in SurA existieren.

5.1.1 Analyse der Interaktion von Peptiden mit MTSSL-markierten SurA-Cys-Proteinen

Im Kontext des SurA-Gesamtproteins waren in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe bereits die Positionen H68, Q223 und N227 untersucht worden [Hennecke, 2006]. So konnte bereits bestätigt werden, dass eine Markierung der Positionen mit der Radikalsonde MTSSL keinen Einfluss auf die Chaperon-Aktivität von SurA hat. Da die ESR-spektroskopischen Analysen jedoch keine eindeutigen Ergebnisse geliefert hatten, wurden diese Positionen im Rahmen dieser Arbeit erneut untersucht.

Die Position H68 wurde nochmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, um die Frage zu beantworten, ob es sich bei dem Peptid Pep46 um ein His-tag-bindendes Peptid handelt. In den

obengenannten Studien der Arbeitsgruppe waren nicht eindeutige Ergebnisse in der ESR-Spektroskopie erhalten worden, welche zu dieser Vermutung führten. Das Screening der Peptid-Bibliotheken war mit SurA-Varianten, die über einen C-terminalen His-tag verfügten, durchgeführt worden [Hennecke, 2006]. Innerhalb der Struktur befindet sich die Position H68 in direkter räumlicher Nähe zum C-terminalen His-tag, so dass bei Bindung des Peptides Pep46 an den His-tag durchaus eine Änderung des ESR-Spektrums zu beobachten sein könnte. Aufgründessen wurde die Position H68C in SurA-Proteinen mit und ohne C-terminalen His-tag ESR-spektroskopisch untersucht. In diesen Versuchen wurden übereinstimmende Spektren für diese Position erhalten, sowohl in An- als auch in Abwesenheit des Peptides Pep46. Somit konnte die Annahme der His-tag-Bindung durch das Peptid Pep46 nicht bestätigt werden und die weiteren Versuche wurden weiterhin mit diesem Peptid und His-tag enthaltenden SurA-Proteinen durchgeführt.

Für die Positionen Q223 und Q227 konnte durch eine zu gering eingesetzte Proteinkonzentration in den ESR-Analyse und daraus resultierend einem zu geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses eine zu starke Immobilisierung der Radikalsonde MTSSL nicht ausgeschlossen werden [Hennecke, 2006]. Da diese beiden Positionen jedoch sehr nah an der postulierten Peptidbindestelle in der Parvulin-Domäne I liegen [Xu *et al.*, 2007] und die vorliegenden Daten keine abschließende Aussage zuließen, wurde eine weitere Untersuchung dieser Positionen im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Die Proteine SurA_Q223C und SurA_N227C wurden in für die ESR-Spektroskopie ausreichenden Mengen produziert und daraufhin Ansätze mit einer höheren Proteinkonzentration als in den vorangegangenen Studien analysiert. Für die Position Q223C konnte jedoch auch mit der erhöhten Proteinkonzentration nur ein unspezifisches Rauschen erhalten werden. Dies deutet darauf hin, dass diese Position im Kontext des SurA-Gesamtproteins zu sehr innerhalb der Struktur verborgen ist und daher für eine Markierung mit der Radikalsonde nicht zugänglich ist.

Das Spektrum für das SurA_N227C-Protein zeigte eine relativ stark immobilisierte Radikalsonde. Durch die Zugabe des Peptides Pep46 veränderte sich das Spektrum dahingehend, dass eine weitere Verringerung aufgrund der Bindung des Peptides in der Umgebung der Sonde angenommen wurde.

Insgesamt zeigte sich in diesen Versuchen, dass die Markierung von Positionen an potentiellen Substratbindstellen innerhalb des SurA-Gesamtproteins schwierig bis nicht möglich ist, seine Interaktion mit Peptiden mit Hilfe dieser Methode grundsätzliche jedoch nachweisbar sein sollte. Das für SurA_N227C-MTSSL mit Pep46 beobachtete ESR-Signal war hierfür ein erster Hinweis. Daher wurden weitere Untersuchungen mit der isolierten Parvulin-Domäne I von SurA durchgeführt.

5.1.2 Analyse der Interaktion von Peptiden mit MTSSL-markierten SurAI-Cys-Proteinen

In der Parvulin-Domäne I von SurA ist in proteinkristallographischen Studien eine Peptidbindestelle identifiziert worden [Xu *et al.*, 2007]. Diese Studien wurden mit dem artifiziellen Peptid PepC, welches durch *phage display* detektiert worden ist und über eine α -helikale Struktur verfügt. Das SurA-Protein bindet präferentiell an OMPs der äußeren Membran von *E. coli* [Behrens *et al.*, 2001], die primär eine β -Strang-Struktur ausbilden. In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe wurden Peptidbibliotheken der OMPs OmpF und Lamb erstellt [Hennecke, 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun im direkten Vergleich

DISKUSSION

untersucht werden, ob Peptide von biologisch relevanten Substraten in vergleichbarer Weise in der postulierten Substratbindestelle binden wie das artifizielle Peptid PepC.

Basierend auf den verfügbaren Kristallstruktur-Daten von SurA [Bitto and McKay, 2002; Xu *et al.*, 2007] wurden Aminosäure-Reste zum Austausch gegen Cystein ausgewählt, die einerseits möglichst exponiert vorliegen und sich andererseits nahe der postulierten Bindestelle in der Parvulin-Domäne I befinden. Die Positionierung der Sonde innerhalb des Proteins ist von entscheidender Bedeutung für die Auswertung der Versuche, da je freier und unbeeinflusster die Umgebung der Radikalsonde MTSSL sich darstellt, desto sensibler diese auf eine Interaktion mit Molekülen reagiert. Um dies zu gewährleisten, wurde die voraussichtliche Beweglichkeit der Sonde virtuell mittels des Programms *Insight II* überprüft. Durch diesen virtuellen Austausch der Reste gegen Cystein und die Markierung mit MTSSL wurden die aussichtsreichsten Positionen für die ESR-Spektroskopie ermittelt und die Positionen Q191, D211, Q223, M231, E238 und V263 für die weitere Analyse ausgewählt.

Die Gewinnung MTSSL-markierter SurAI-Proteine in einer für die ESR-Analyse ausreichenden Menge wurde sowohl durch eine zu geringe Ausbeute aus der periplasmatischen Proteinpräparation, als auch durch eine ausgeprägte Dimerisierungstendenz der unmarkierten SurAI-Cys-Proteine erschwert. Daher musste das Verfahren der Reinigung und Markierung der Proteine mit MTSSL zunächst entsprechend modifiziert werden.

Die Positionen Q191 und D211 sollten als Negativkontrollen dienen, da diese in der Parvulin-Domäne I eher auf der der postulierten Peptidbindestelle abgewandten Seite und somit weit außerhalb der PepC-Bindestelle liegen. Daher wurde eine direkte Beteiligung an der Peptidbindung als eher unwahrscheinlich angenommen. Dennoch wurden auch die ESR-Spektren von SurAI-Cys-Proteinen mit der Radikalsonde MTSSL in den Positionen Q191 und D211 durch die Anwesenheit SurA-bindender Peptide beeinflusst. Das Peptid PepC bewirkte eine geringfügige Änderung des ESR-Spektrums von SurAI_Q191C-MTSSL, welche auf eine bindungsinduzierte Konformationsänderung innerhalb des Proteins hinweist. Mit dem Peptid Pep46 wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang die unterschiedliche Sekundärstruktur der verwendeten Peptide eine Rolle (PepC α -helikal gegenüber Pep46 β -Strang). Die Variante SurAI_D211C-MTSSL hingegen ließ in Anwesenheit aller getesteten SurA-bindenden Peptide aus den Substrat-Bibliotheken (Pep46, Pep54 und Pep95) leichte Änderungen des ESR-Spektrums erkennen, die auf eine Zunahme der Mobilität der Sonde hinweisen. Diese Änderungen könnten durch eine konformationelle Änderung des Proteins durch die Peptidbindung an einer anderen Stelle begründet werden. Für das Peptid PepC wurden diese Änderungen nicht beobachtet. Da jedoch auch die Anwesenheit des nicht SurA-bindenden Peptides Pep71 zu einem ähnlichen, wenn auch geringeren Effekt führte, ist eine unspezifische Interaktion der Peptide mit der isolierten Domäne I von SurA nicht auszuschließen.

Die ESR-Spektren der Proteine SurAI_Q223C-MTSSL und SurAI_E238C-MTSSL in Anwesenheit von PepC und Pep46 sprechen für eine Bindung dieser Peptide in näherer Umgebung der Radikalsonden. Die SurA-bindenden Peptide Pep54 und Pep95, sowie das nicht SurA-bindende Peptid Pep71 hatten hingegen keinen Einfluss auf die ESR-Spektren dieser beiden Proteine. In Anwesenheit des Peptides PepC lagen

DISKUSSION

innerhalb der publizierten Kristallstrukturen die untersuchten SurA-Proteine und damit auch die Parvulin-Domäne I in dimerisierter Form vor [Xu *et al.*, 2007]. Hierbei lagen sich die Positionen Q223 der beiden Untereinheiten gegenüber, so dass sich die Sonde im Protein SurAI_Q223C-MTSSL in der Position befände, die bei der Dimerisierung, wie sie in den SurA:PepC-Komplexen beobachtet wurde, eine *spin-spin*-Interaktion erwarten ließe. Ein entsprechendes *spin-spin*-Signal wurde in der ESR-Spektroskopie jedoch auch in Anwesenheit von PepC nicht beobachtet.

Diese Interaktion wäre nur nachweisbar, wenn sich die beiden MTSSL-markierten Positionen Q223 direkt gegenüber und somit in Reichweite einer spezifischen *spin-spin*-Interaktion der gebundenen Radikalsonden an dieser Stelle lägen. Hiermit könnte ein Nachweis für die Dimerisierung der SurAI-Proteine in der ESR-Spektroskopie erbracht werden. Die virtuelle Analyse wurde mit den Strukturen des SurAI-PepC- und des SurANICt:PepC-Komplexes von [Xu *et al.*, 2007] durchgeführt. Bei beiden Varianten trat eine Dimerisierung des SurA-Proteins bei der Bindung von PepC auf. Da das entsprechende *spin-spin*-Signal jedoch nicht erhalten wurde, sind möglicherweise die Ausrichtung und der Abstand der Radikalsonden entgegen der Ergebnisse der virtuellen Analyse mittels *Insight II* hierfür nicht optimal. Die Sonde könnte sich in der untersuchten Proteinklösung doch anders als in der virtuellen Analyse anhand der proteinkristallographischen Struktur ausrichten und dadurch der Abstand für die Ausbildung einer detektierbaren *spin-spin*-Interaktion zu groß werden.

Für die Substratabgeleiteten Peptide wurde ebenfalls nur die Bindung mit der isolierten Parvulin-Domäne I analysiert. Da diese sich in der vorhergesagten Struktur (β -Strang) von PepC (α -helikal) unterscheiden, kann für diese Peptide auch ein verändertes Bindeverhalten und ein daraus resultierendes, alternatives Aussehen des Protein:Peptid-Komplexes nicht ausgeschlossen werden. Die Dimerisierung des SurAI-Peptid- und des SurANICt-Peptid-Komplexes war jedoch auch nur in Anwesenheit des Peptides PepC beobachtet worden. Bei weiteren Analysen mit einem kürzeren Peptid lag der Protein:Peptid-Komplex in monomerer Form vor [Xu *et al.*, 2007]. Daher könnte es auch sein, dass die substratabgeleiteten Peptide nicht zu einer Dimerisierung führen und somit auch keine *spin-spin*-Interaktion detektiert werden kann.

Im Kontext vorangegangener Versuche unserer Arbeitsgruppe zur Identifizierung funktionsrelevanter Aminosäuren in SurA durch ortsgerechte Mutagenese war kein Effekt einer M231S-Mutation auf die *in vivo*-Funktion von SurA beobachtet worden (Dr. habil. S. Behrens-Kneip, persönliche Kommunikation). Die Strukturdaten sprechen jedoch für eine direkte Beteiligung der Aminosäure M231 von SurA an der Bindung von PepC [Xu *et al.*, 2007]. Die Platzierung der Radikalsonde MTSSL in dieser Position zur Generierung von SurAI_M231C-MTSSL sollte daher zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Peptidbindung führen. Erwartungsgemäß blieb das ESR-Spektrum dieses Proteins in Anwesenheit aller Peptide, einschließlich PepC, unverändert.

Um zu überprüfen, ob SurAI mit der Mutation M231C noch in der Lage ist, Peptide zu binden, wurde die Interaktion der Proteine SurAI, SurAI_M231C bzw. SurAI_M231C-MTSSL mit Fluoreszenz-markiertem Peptid Pep46 (Pep46-IAANS) untersucht. Diese fluoreszenzspektroskopische Analyse hat bestätigt, dass das Peptid Pep46 an SurAI bindet. Diese Bindung wird jedoch durch die Mutation M231C und die

DISKUSSION

Markierung mit der Radikalsonde MTSSL stark beeinträchtigt. Dies stimmt mit den Daten überein, dass die Mutationen M231R und L239R *in vitro* zu einer reduzierten Bindungsaffinität des Peptides PepC an SurAI führten [Xu *et al.*, 2007]. Eine fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der Konkurrenz von PepC und Pep46-IAANS und die Bindung an SurA bzw. SurAI waren aufgrund der Interaktion beider Peptide und der resultierenden Signalüberlagerung nicht möglich (*data not shown*). Zusätzlich wurde die korrekte Faltung des SurAI_M231C-Proteins mittels CD-Spektroskopie überprüft (durchgeführt in der Arbeitsgruppe von PD Dr. H.-J. Kleinschmidt, Konstanz, heute Kassel). Die CD-spektroskopische Messungen sprechen für eine korrekte Faltung des SurAI_M231C-Proteins. Zusammenfassend wird das Protein SurAI_M231C vergleichbar zu SurAI gefaltet, doch die eingeführte Mutation führt zu einer signifikanten Einschränkung der Bindungsfähigkeit von Peptiden.

Die Position V263 liegt am oberen Rand der postulierten Peptidbindestelle in SurAI und könnte daher auch an der Peptidbindung beteiligt sein. Die starke Tendenz zur Dimerisierung von SurAI_V263C führte zu einer geringeren Proteinkonzentration in der ESR-Spektroskopie von MTSSL-markiertem, monomerem Protein. Durch das daraus resultierende geringere Signal-zu-Rausch-Verhältnis können kleinere Veränderungen der ESR-Spektren nicht detektiert werden. Die bisherigen Daten deuten nicht auf eine große Veränderung des ESR-Spektrums von SurAI_V263C-MTSSL in Anwesenheit der untersuchten Peptide hin. Um eine abschließende Aussage zu treffen, sollte durch eine Erhöhung der Proteinkonzentration das Signal-zu-Rausch-Verhältnis optimiert werden.

In den durchgeführten Versuchen haben alle analysierten SurAI-Varianten in hohem Maße Dimere in Lösung gebildet. Durch das Vorhandensein dieser ausgeprägten Dimerisierungstendenz der unmarkierten Proteine und um eine größere Menge an markierten SurAI-Proteinen zu erhalten, wurden die mit dem potenten Reduktionsmittel TCEP versetzten Proteine unmittelbar nach der Behandlung direkt zur Lösung mit der Radikalsonde gegeben. Dieses Vorgehen war bei den vorangegangenen Versuchen mit den SurA-Proteinen nicht notwendig gewesen, da diese nicht so eine ausgeprägte Dimerisierungstendenz aufgewiesen haben. Diese verstärkte Dimerisierung der SurAI-Proteine ist vermutlich auf die wesentlich geringere Größe dieser Protein im Vergleich zum SurA-Gesamtprotein zurückzuführen. In diesen kleineren Proteinen liegen die Cysteine wesentlich exponierter vor und sind dadurch für eine Bindung leichter zugänglich.

Die Dimere der SurAI-Proteinlösung sollten durch zusätzliche Reinigung per Gelfiltration entfernt werden. Für die letztendliche Analyse wurden Fraktionen verwendet, die möglichst wenig bis kein Dimer mehr aufwiesen. Dies war aufgrund des geringen Größenunterschiedes zwischen Monomer und Dimer und der daraus resultierenden begrenzten Auftrennung dieser unterschiedlichen Fraktionen nur begrenzt möglich. Daher konnte die Menge des dimerisierten SurAI-Proteins lediglich reduziert, jedoch nicht vollständig entfernt werden. Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf der Porengröße des verwendeten Säulenmaterials und der Fließgeschwindigkeit durch die Säule. Eventuell könnte man daher durch Verwendung eines alternativen Säulenmaterials mit einer anderen Ausschlussgröße und einer verminderten Flussgeschwindigkeit durch die Säule die Auftrennung optimieren und somit eine größere Menge an monomeren, mit MTSSL markierten SurAI-Proteinen erhalten.

DISKUSSION

Die hier durchgeführten ESR-spektroskopischen Studien bestätigen eine Interaktion des artifiziellen Peptides PepC mit der von [Xu *et al.*, 2007] postulierten Bindestelle in SurAI. Sie zeigen ferner, dass auch das OMP-Peptid Pep46 in diesem Bereich von SurA bindet.

Für das Peptid Pep46 konnte ein direkter Einfluss auf die Positionen Q223, E238 und N227 nachgewiesen werden. Für die Position D211 wurde eine konformationelle Änderung des SurAI-Proteins beobachtet, die jedoch nicht signifikant war. In Anwesenheit des Peptides PepC wurde ein direkter Einfluss auf die Positionen Q223 und E238 gezeigt. Durch die Änderung des ESR-Spektrums von SurAI_Q191C-MTSSL in Anwesenheit von PepC wurde eine konformationelle Änderung des Proteins an dieser Position angenommen. Unterschiede in dem Bindungsverhalten der Peptide PepC und Pep46 sind vermutlich durch ihre unterschiedliche Konformation (α -helikal versus β -Strang) begründet. Auch wenn die Peptide möglicherweise nicht identisch innerhalb des Proteins binden, so sprechen die ESR-Daten dafür, dass die Bindestellen von PepC und Pep46 zumindest überlappen (Abb. 29).

Eine spezifische Interaktion der SurA-bindenden OMP-Peptide Pep54 und Pep95 mit der PepC-Bindestelle in SurAI konnte nicht nachgewiesen werden. Dies könnte auf die Existenz weiterer, bisher noch unbekannter Bindungsstelle(n) in SurA hinweisen. Alternativ wäre es auch möglich, dass diese Peptide nur unspezifisch an SurA binden. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, sollten die mit dem Fluorophor IAANS markierten Peptide Pep54-IAANS und Pep95-IAANS synthetisiert und ihre Bindung an SurA in fluoreszenzspektroskopischen Bindungsstudien analysiert werden, bevor weitere Versuche mit diesen durchführt werden.

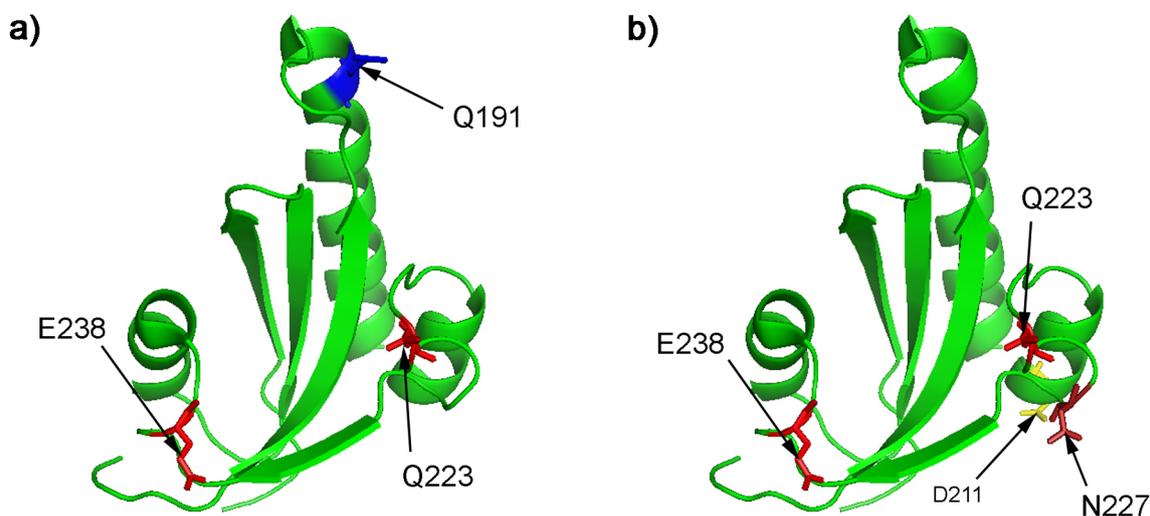


Abb. 29: Schematische Darstellung der Ergebnisse der ESR-Spektroskopie. Gezeigt ist jeweils die isolierte Parvulin-Domäne I von SurA mit den Positionen aus der ESR-Spektroskopie, für die eine Änderung der Spektren in Kombination mit der Bindung der Peptide PepC (a) bzw. Pep46 (b) beobachtet werden konnte. Unterschieden wird hierbei zwischen direkten Effekten (rot; Q223 und E238), durch konformationelle Änderungen hervorgerufene Effekte (blau; Q191) und unspezifischen Einflüssen (gelb; D211), die durch die Peptidbindung an SurAI hervorgerufen wurden, sowie Spektren-Änderungen, die im SurA-Gesamtprotein beobachtet wurden (braun; N227). Die Ergebnisse für das Peptid PepC unterstützen die Erkenntnisse aus der Kristallstruktur für die Peptidbindestelle in SurAI [Xu *et al.*, 2007]. Für Pep46 konnte eine Bindung im Bereich dieser Bindestelle beobachtet werden.

Insgesamt war der Nachweis einer spezifischen SurA-Peptid-Interaktion mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nur bedingt möglich, da in vielen Fällen nur sehr geringfügige Änderungen der Spektren zu beobachten waren. Sogar die Bindung von PepC an die Parvulin-Domäne I von SurA, die proteinkristallographisch nachgewiesen ist [Xu *et al.*, 2007], hatte nur geringen Einfluss auf die Spektren von Radikalsonden im unmittelbaren Bereich der postulierten Peptidbindestelle. Möglicherweise sind die Interaktionen zwischen den Peptiden und dem Protein zu kurzlebig, um diese mittels der ESR-Spektroskopie darzustellen. Da schon der Nachweis der spezifischen Interaktion von PepC schwierig war, wurde dieses experimentelle Verfahren daher als nur bedingt geeignet zur Identifikation weiterer, gegebenenfalls auch unspezifischer Substratbindestellen in SurA bewertet und im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

5.2 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels des ToxR-Systems

Die Bindung eines artifiziellen Peptides PepC an die um die Parvulin-Domäne II deletierte SurA-Variante SurANICt wurde kristallographisch dargestellt [Xu *et al.*, 2007]. In dieser Darstellung wurde das Peptid PepC zwischen zwei SurAI-Domänen in einem SurA-Peptid-Dimer gebunden (siehe Abb. 4, PDB ID: 2PV3). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die in den SurA:Peptid-Strukturen beobachteten SurA:Peptid- und SurA:SurA-Kontakte auch *in vivo* eine Rolle spielen. Die an diesen Kontakten beteiligten Aminosäuren wurden in den ToxR'SurA-Fusionsproteinen einzeln und in Kombination mutiert und die Oligomerisierung der mutierten Proteine im ToxR-Assay anhand der resultierenden β -Galaktosidase-Aktivität ermittelt. Hierbei sollten die folgenden Fragen betrachtet werden:

- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Substratbindung an die Parvulin-Domäne I und der *in vivo*-Oligomerisierung von SurA?
- Spielen die in den kristallographischen Strukturen beobachteten SurA:SurA-Kontakte eine Rolle *in vivo*?
- Bindet die PPIase-aktive Parvulin-Domäne II ebenfalls Substrat?

Es wurden einzelne Domänen oder Fragmente von SurA analysiert, um direkte Aussagen über den Effekt einzelner Mutationen vor dem Hintergrund des komplexen Interaktionsnetzwerkes innerhalb des SurA-Gesamtproteins treffen zu können.

Vor der Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität im ToxR-Assay wurden die mutierten Varianten von ToxRSurANcT, ToxR'SurANICt und ToxR'SurANIICt in einem Komplementationstest analysiert. Als Referenz diente jeweils die entsprechende unmutierte Variante. Mittels dieses Komplementationstests wird die Fähigkeit der untersuchten Proteine bestimmt, den synthetisch letalen Phänotypen einer *surA* *sep*-Doppelmutante zu komplementieren und es kann die *in vivo*-Funktion der unterschiedlichen Varianten bewertet werden.

Parallel zur Analyse der eingeführten Mutationen im ToxR-Assay wurde auch die zelluläre Konzentration der jeweiligen Proteine im *Western Blot* ermittelt. Hierbei wurde die Proteinkonzentration der mutierten SurA-Varianten in Relation zu den unmutierten SurA-Varianten bestimmt. Dies war relevant, um

eventuelle Effekte, die aus einer veränderten Proteinkonzentration resultieren, in die Analyse einzubeziehen.

Basierend auf diesen Versuchen wurden die Effekte der eingeführten Mutationen in die ToxR⁺SurA-Varianten analysiert, um die obengenannten Fragen zu beantworten. Die Reihenfolge der diskutierten Ergebnisse richtet sich im Folgenden nach der Beantwortung der aufgeworfenen Fragen und nicht nach der Zusammenstellung der Versuche im Ergebnisteil. Abschließend wird ein kurzes Résumé gezogen.

5.2.1 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Substratbindung an die Parvulin-Domäne I und der *in vivo*-Oligomerisierung von SurA

Zunächst soll der Zusammenhang zwischen der Substratbindung an die Parvulin-Domäne I und der *in vivo*-Oligomerisierung näher betrachtet werden. Basierend auf den Daten der veröffentlichten Substratbindestelle in der Parvulin-Domäne I von SurA scheinen die Positionen M231 und L239 von besonderer Bedeutung für die Bindung von PepC zu sein. Werden diese gegen Arginin mutiert (M231R bzw. L239R) so wurde *in vitro* eine verminderte Bindungsaffinität für das Peptid PepC an SurAI nachgewiesen [Xu *et al.*, 2007]. Des Weiteren liegen die Positionen F243 und V263 im kristallographisch dargestellten SurA-Peptid-Dimer direkt in bzw. nahe der Peptidbindestelle des artifiziellen Peptides PepC und könnten daher auch an der Substratbindung beteiligt sein [Xu *et al.*, 2007]. Daher wurde zunächst der Effekt der Mutationen M231R, L239D, F243D und V263R auf die *in vivo*-Oligomerisierung der Proteine ToxR⁺SurAI, ToxR⁺SurAI+II und ToxR⁺SurANICt betrachtet.

Durch die Einführung der Mutationen M231R, L239R und F243D in ToxR⁺SurAI wurde eine deutliche Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität erhalten. Die erhaltenen Werte waren hierbei nahezu bis auf das Niveau der Negativkontrolle, des monomeren Kontrollproteins ToxR⁺MalE reduziert. Dies spricht für vorangegangene Befunde, dass PPIase-Domänen zur Oligomerisierung von Proteinen führen [Saul *et al.*, 2004]. Dennoch ist die verminderte β -Galaktosidase-Aktivität eventuell nicht ausschließlich auf die verminderte Oligomerisierung der untersuchten Proteine zurückzuführen, da in den parallel analysierten *Western Blots* die nachgewiesene zelluläre Konzentration der Proteine ebenfalls verringert gewesen ist, wenn auch in etwas geringerem Ausmaß.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die Einführung der Mutationen M231R, L239R und F243D in ToxR⁺SurAI+II erhalten. Somit konnte mittels der ToxR-Analyse ein Hinweis für die Beteiligung der Peptidbindestelle in der Parvulin-Domäne I von SurA an der *in vivo*-Substratbindung erbracht werden. Des Weiteren konnte die durch Substratbindung induzierte Oligomerisierung gezeigt werden.

Im Kontext des ToxR⁺SurANICt-Proteins führte die Einführung der Mutationen M231R, L239R und F243D zu keiner signifikanten Reduzierung der β -Galaktosidase-Aktivität. Dies lässt vermuten, dass neben den an der Peptidbindung beteiligten Aminosäuren in der Parvulin-Domäne I innerhalb des ToxR⁺SurANICt-Proteins noch weitere Aminosäuren an der Oligomerisierung beteiligt sind.

Auch die zelluläre Konzentration der untersuchten ToxR⁺SurANICt-Proteine zeigte keine veränderte Protein-Dosis, wie sie bspw. bei den ToxR⁺SurAI-Varianten beobachtet worden war. In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass die Parvulin-Domäne I von SurA für die *in vivo*-Funktion des Proteins nicht

DISKUSSION

benötigt wird [Behrens *et al.*, 2001]. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen führten auch die obengenannten Mutationen zu keiner Einschränkung in der Fähigkeit von ToxR'SurANICt zur Komplementation des synthetisch letalen Phänotyps einer *surA skp*-Doppelmutante.

Die Mutation V263R liegt etwas oberhalb und außerhalb der postulierten Peptidbindestelle in SurAI. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte für diese Mutation weder in SurAI noch in SurANICt eine negative Reduktion der Dimerisierungsfähigkeit der ToxR-Fusionsproteine nachgewiesen werden. Daher wurde daraus in Kombination mit den ähnlichen Ergebnissen aus der ESR-Spektroskopie geschlossen, dass V263 nicht an der Substratbindung beteiligt ist und die weitere Analyse dieser Position wurde daraufhin eingestellt.

5.2.2 Untersuchung der Rolle der in den kristallographischen Strukturen beobachteten SurA:SurA-Kontakte *in vivo*

Neben den Substrat-vermittelten Kontakten interagieren auch Aminosäuren im Chaperon-Modul SurANcT der innerhalb des SurANICt:PepC-Komplexes beteiligten SurANICt-Proteine miteinander. Mittels der Mutation dieser Kontaktstellen wurde die Relevanz dieser Kontakte für die Oligomerisierung und die *in vivo*-Funktion von SurA untersucht. In den kristallographischen Strukturen stehen sowohl die beiden C-terminalen Helices (Ct) der Chaperon-Modul, als auch die im N-Terminus lokalisierten Helices 6 (H6) und 3 (H3) über elektrostatische Wechselwirkungen miteinander in Kontakt. Basierend auf den Strukturdaten scheinen die Positionen D395 und M402 im C-Terminus einen Einfluss auf die Bildung von Protein-Protein-Interaktionen zu haben. Am Interaktionspunkt der Helices 6 und 3 scheinen die Positionen Q155, E158 und S159 (in Kombination mutiert als Mutation H6M3) aufgrund ihrer räumlichen Orientierung und der daraus resultierenden Wechselwirkungen für den Zusammenhalt verantwortlich zu sein.

Für die ToxR-Analyse wurden die obengenannten H6:H3- und die C-terminalen Kontakte gezielt einzeln oder in Kombinationen mutiert und der Effekt der Mutationen auf die β -Galaktosidase-Aktivität (ToxR-Assay) und die *in vivo*-Funktion (Komplementationstest) bewertet. Hierbei wurden die Proteine ToxR'SurANcT, ToxR'SurANICt und ToxR'SurANIICt für die Einführung der Mutationen verwendet und im ToxR-Assay analysiert.

In der C-terminalen Helix wurden die Positionen D394 und M402 für die Mutation ausgewählt. Die Mutation des Ct:Ct-Kontakts D395A spielt keine Rolle bei der Oligomerisierung der Proteine ToxR'SurANcT, ToxR'SurANICt und ToxR'SurANIICt. Dennoch scheint diese Mutation eine Rolle für die *in vivo*-Funktion des SurA-Proteins in Anwesenheit einer der beiden Parvulin-Domänen zu spielen und zwar unabhängig von der Oligomerisierung. Dies wird deutlich, da die Mutation D395A in ToxR'SurANICt und ToxR'SurANIICt in Kombination mit M402R zu einer verschlechterten *in vivo*-Funktion der Proteine resultiert. In ToxR'SurANcT wurde dieser Effekt jedoch nicht beobachtet. Worauf dieser beobachtete Effekt beruht, bleibt noch in weiterführenden Arbeiten zu klären.

Innerhalb des ToxR'SurANcT-Proteins führt die Mutation M402R im C-Terminus zu einer stark verminderten Oligomerisierungsfähigkeit, ohne jedoch die *in vivo*-Funktion des Chaperon-Moduls

DISKUSSION

SurANcT zu beeinträchtigen. Diese Reduktion der Oligomerisierung kann trotz der relativ hohen Schwankungen der zellulären Proteinkonzentration zwischen den unabhängigen Versuchsreihen als signifikant bewertet werden. Der Einfluss der Position D395 scheint hingegen nur relativ gering zu sein, da bei der Variante ToxR'SurANcT nur ein geringer Verlust der Dimerisierungsfähigkeit beobachtet wurde. Da dieser Effekt in Kombination mit M402R nicht weiter verstärkt werden konnte, wurde die Mutation D395A nicht mehr in allen weiteren Versuchen untersucht, da deren Einfluss als zu gering bewertet wurde.

Vergleichbares gilt für die Analyse der Mutation der H6:H3-Kontakte. Diese erfolgten lediglich innerhalb des isolierten Chaperon-Moduls SurANcT, da auch diese für die *in vivo*-Oligomerisierung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen und der beobachtete Effekt relativ gering ausfiel.

Im Kontext der Proteine ToxR'SurANICt und ToxR'SurANIICt führten die untersuchten Mutationen der C-terminale Helix weder zu einem signifikanten Effekt der Oligomerisierungsfähigkeit noch der *in vivo*-Funktion der Proteine. Um den beobachteten Effekt ggf. zu verstärken, wurde die Ct:Ct-Mutation M402R in Kombination mit den Mutationen der PepC-Bindestelle der Parvulin-Domäne I von SurA (M231R, L239D bzw. F243D) in ToxR'SurANICt untersucht. Doch auch die kombinierte Mutation der genannten Aminosäuren führte zu keinem signifikanten Verlust der Oligomerisierungsfähigkeit oder der *in vivo*-Funktion von ToxR'SurANICt. Demnach scheinen noch weitere Kontakte in die Interaktion des SurANICt:PepC-Komplexes involviert zu sein, die bisher anhand der verfügbaren Strukturdaten noch nicht identifiziert und demnach noch nicht getestet worden sind.

5.2.3 Untersuchung der Substratbindung der PPIase-aktiven Parvulin-Domäne II von SurA

Die spezifischen Bindungspartner der SurA:Peptid- bzw. SurA:SurA-Kontakte konnten mittels der verfügbaren Strukturdaten des SurA:Peptid-Dimers ausgewählt werden. Dies war dagegen für die Parvulin-Domäne II von SurA, die die PPIase-Aktivität des Proteins vermittelt [Behrens *et al.*, 2001], nicht möglich, da diese in der SurA-Peptid-Kristallstruktur deletiert war [Xu *et al.*, 2007]. Die Struktur der Parvulin-Domäne und auch die Peptidbindestelle innerhalb der Parvulin-Domänen ist hoch konserviert [Bayer *et al.*, 2003; Kuhlewein *et al.*, 2004; Weininger *et al.*, 2010]. Die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren sind auch in der PPIase-inaktiven Parvulin-Domäne I von SurA an der im Kristall beobachteten Peptidbindung beteiligt [Xu *et al.*, 2007]. Daher wurde angenommen, dass auch die komplementären Aminosäuren innerhalb der Parvulin-Domäne II an der Substratbindung und auch an der *in vivo* Oligomerisierung beteiligt sein könnten. Somit wurden die Mutationen L341D, F349D und F353D für die weitere Analyse in ToxR'SurAI+II und ToxR'SurANIICt ausgewählt.

Die eingeführten Mutationen führten zu einer Reduktion der Oligomerisierung der untersuchten Proteine. Da die zelluläre Konzentration jedoch ebenfalls leicht bis stark vermindert war, konnte dieser Effekt nicht ausschließlich auf die analysierten Mutationen zurückgeführt werden. In den durchgeführten Versuchen war die zelluläre Konzentration teilweise bis auf ein Viertel der Wildtypkonzentration reduziert. Worauf

diese überaus starke Reduktion der Proteinkonzentration zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Bei den in der Parvulin-Domäne II mutierten Aminosäuren handelt es sich eigentlich nicht um strukturrelevante Aminosäuren, sondern um Aminosäuren, die den bindungsrelevanten Aminosäuren der postulierten Peptidbindestelle entsprechen (siehe Abb. 18). Laut veröffentlichter kristallographischer Strukturdaten ist die Parvulin-Domäne II von SurA eine Satellitendomäne, die über einen flexiblen Linker mit dem Kernmodul SurANICt verbunden ist [Bitto and McKay, 2002]. Möglicherweise gibt es intramolekulare Interaktionen zwischen der Parvulin-Domäne II und weiteren Bereichen innerhalb des SurA-Kernmoduls und diese Domäne spielt somit eine Rolle für die Stabilität des Proteins.

Das humane Protein *hPin1* gehört ebenfalls zur Familie der Parvuline und besteht aus einer N-terminalen WW Domäne und einer C-terminalen PPIase-Domäne, die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind [Ranganathan *et al.*, 1997]. Hierbei liegt die Substraterkennungsstelle in einer hydrophoben Tasche zwischen den beiden Domänen [Ranganathan *et al.*, 1997]. Für die Funktion von *hPin1* und die Substratbindung ist die Flexibilität von hoch-konservierten Aminosäureseitenketten entscheidend [Namanja *et al.*, 2007]. Möglicherweise resultiert die Mutation von Aminosäureseitenketten innerhalb der Parvulin-Domäne II von SurA auch zu einer gestörten Bindungsfähigkeit einerseits zu Substraten, andererseits eventuell auch zu anderen Bereichen des SurA-Proteins, die zu einer Destabilisierung des Proteins führt.

Zu bemerken ist jedoch, dass trotz der zum Teil extrem verringerten Proteinkonzentration die *in vivo*-Funktion der untersuchten SurANIICt-Varianten nicht bzw. nur leicht verringert ist. D.h. der Effekt, der zu der Verringerung der zellulären Proteinkonzentration führt, spielt keine signifikante Rolle bei der *in vivo* Funktion des Proteins.

5.2.4 Zusammenfassung der Analyse der *in vivo*-Oligomerisierung von SurA im ToxR-System

Zusammenfassend kann man sagen, dass die aus den kristallographischen Strukturen ermittelten SurA:Peptid- und SurA:SurA-Kontakte für die *in vivo*-Funktion der untersuchten ToxR'SurA-Proteine keine Relevanz besitzen, da in dem verwendeten Komplementationversuch keine signifikanten Einflüsse gesehen wurden. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass der verwendete Komplementationstest nicht sehr sensitiv ist und daher geringfügige Änderungen der *in vivo*-Funktion nicht detektiert werden können. Um auch kleinere Effekte zu messen, müsste man dann auf alternative Methoden umsteigen. Für die Analyse der Chaperonfunktion könnte man bspw. die Analyse der thermalen Aggregation der Citrat-Synthase verwenden [Buchner *et al.*, 1998]. Diese Methode wurde bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zum Nachweis der Chaperonaktivität von SurA verwendet [Behrens *et al.*, 2001; Hennecke, 2006].

Auch wenn die obengenannten Kontakte keinen signifikanten Einfluss auf die *in vivo*-Funktion von SurA haben, so spielen diese dennoch eine Rolle bei der *in vivo*-Oligomerisierung und der Substratbindung.

Die Daten für ToxR'SurAI weisen darauf hin, dass die von [Xu *et al.*, 2007] postulierte Peptidbindestelle in der Parvulin-Domäne I von SurA auch *in vivo* an der Bindung von Substraten teilhat. Hierbei erfolgt die

DISKUSSION

Induktion der Dimerisierung der isolierten Parvulin-Domäne I durch die Bindung von Substrat innerhalb des Proteins. Die Dimerisierung von Parvulin-Domänen wurde schon in vorangegangenen Studien gezeigt. So führte bspw. auch die Oligomerisierung der PPIase-Domäne von FkpA zur Oligomerisierung der Proteine [Saul *et al.*, 2004]. Weiterhin wurde mit Par27 aus *Bordetella pertussis* das erste Parvulin identifiziert, welches symmetrische Homodimere bildet [Hodak *et al.*, 2008; Clantin *et al.*, 2010]. Dies ist besonders interessant, da Par27, vergleichbar zu SurA, über eine PPIase- und eine Chaperon-Funktion verfügt und ebenfalls eine hohe Affinität für Proteine mit vielen amphipathischen β -Strukturen, die es auch in OMPs gibt, aufweist [Hodak *et al.*, 2008]. Des Weiteren weist Par27 auch teilweise strukturelle Ähnlichkeiten zu SurA und Trigger Faktor auf [Clantin *et al.*, 2010]. Dies könnte auch auf eine ähnliche Funktionsweise hindeuten.

Im Kontext des an ToxR-fusionierten Kernmoduls ToxR'SurANICt haben die Mutationen der Aminosäuren in der PepC-Bindestelle M231R, L239R bzw. F243D keinen Einfluss auf die *in vivo*-Oligomerisierung. Trotz der Deletion der Parvulin-Domäne I in ToxR'SurANcT bildet auch diese Variante noch *in vivo* Oligomere. Dabei ist die spezifische Bindung von Substrat an die Parvulin-Domäne I nicht der Grund für die *in vivo*-Oligomerisierung des Chaperon-Moduls SurANcT, da bei dieser Variante die Parvulin-Domäne I deletiert ist. Die beobachtete Oligomerisierung könnte dennoch auf die Substratbindung an noch nicht identifizierten Substratbindestellen innerhalb des Chaperon-Moduls zurückzuführen sein, da das Chaperon-Modul SurANcT auch isoliert *in vivo* voll funktionstüchtig ist [Behrens, 2001 #7] und demnach auch eine Interaktion mit Substrat stattfinden muss. Dies passt auch zu der Annahme, dass die Parvulin-Domäne I von SurA für die Substratspezifität zuständig ist, aber die weiteren Bereiche von SurA auch in der Lage sind, ggf. auch unspezifisch, Substrat zu binden [Xu *et al.*, 2007]. Zusätzlich weisen die Daten darauf hin, dass die C-terminalen Kontakte des SurANICt:PepC-Komplexes einen Einfluss auf die *in vivo*-Oligomerisierung von ToxR'SurANcT haben, aber die Mutation dieser Kontakte keinen Effekt auf die *in vivo*-Funktion des Chaperon-Moduls hat.

PPIasen kommen öfter als Multidomänen-Proteine zusammen mit Chaperonen vor. Bei diesen hat die PPIase-Domäne auch in einigen Fällen die Selektivität für Proteinsubstrate gestellt [Scholz *et al.*, 1997]. Hinweise, die dafür sprechen, wurden auch in dieser Arbeit erhalten. Bisher konnte nur für eines der als starke SurA-Binder identifizierten Peptide eine Interaktion mit der Parvulin-Domäne I von SurA nachgewiesen werden und somit wurden auch weitere Substratbindestellen in anderen Bereichen des SurA-Proteins angenommen (siehe ESR-Spektroskopie).

Auch die Kombination der Mutationen im C-Terminus (M402R) und der Peptidbindestelle in der Parvulin-Domäne I (M231R, L239R bzw. F243D) resultierten in keiner signifikanten Reduktion der Oligomerisierungsfähigkeit und zeigten auch keinen Effekt auf die *in vivo*-Funktion der analysierten Proteine. Weitere Daten der Arbeitsgruppe zeigen, dass bei der Variante ToxR'SurAH6M3_MD_L239D auch die kombinierte Mutation der Kontakte zwischen den Helices 6 und 3 (H6M3), dem C-Terminus (MD) und Substrat (L239D) im Kontext des SurA-Gesamtproteins lediglich zu einer Verringerung der Oligomerisierungsfähigkeit um max 40 % führte (eigene Arbeitsgruppe Praktikum B. Zhang 2008).

DISKUSSION

Die Gesamtinterpretation der Versuche konnte nur in eingeschränktem Maße durchgeführt werden, da aufgrund von teilweise relativ hohen Schwankungen in den absoluten Werten zwischen den unabhängig durchgeführten Versuchsreihen, Aussagen über signifikante Änderungen schwierig waren. So wurden in den Messungen im ToxR-Assay in den durchgeführten Messreihen der verschiedenen Varianten für die absoluten Werte zum Teil sehr unterschiedliche Werte für die β -Galaktosidase-Aktivität erhalten. Dies konnte jedoch durch eine Normierung auf die jeweilige unmutierte ToxR'SurA-Varianten behoben werden. Hierbei wurde der Wert der unmutierten ToxR'SurA-Variante gleich 100 % gesetzt und die weiteren Werte der entsprechenden Versuchsreihe darauf bezogen. Auf diese Weise konnten die Werte der unabhängig voneinander durchgeführten Messreihen direkt miteinander verglichen werden.

Problematisch für eine abschließende Aussage bezüglich der beobachteten Effekte in den ToxR-Assays, war die Interpretation der detektierten zellulären Proteinkonzentrationen. Denn diese waren in einigen Versuchsreihen zum Teil sehr stark reduziert, maximal bis auf 20 % der Wildtyp-Proteinkonzentration. Daher wurden diese Varianten nur als eingeschränkt bewertbar angesehen. Interessant ist hierbei, dass obwohl die zelluläre Proteinkonzentration zum Teil sehr stark reduziert war, die *in vivo*-Funktion des SurA-Proteins hiervon nicht beeinflusst wurde. So war bspw. die β -Galaktosidase-Aktivität von ToxR'SurANIICt_L341D um mehr als die Hälfte reduziert. Die im *Western Blot* detektierte zelluläre Proteinkonzentration betrug bei dieser Variante nur ca. 40 %. Dennoch war die *in vivo*-Funktion des Proteins vollständig erhalten, wie im Komplementationstest gezeigt. Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass der Komplementationstest nicht sehr sensitiv ist und auch stark verminderte Proteinmengen den synthetisch letalen Phänotypen der *surA skp*-Doppelmutante noch vervollständigen können. Daher ist es wohl auch schwierig, mit dieser Methode Aminosäuren zu detektieren, die für die *in vivo*-Funktion von SurA relevant sind.

Insgesamt lassen die erhaltenen Befunde darauf schließen, dass *in vivo* noch weitere Kontakte existieren, die SurA-Substrat- und möglicherweise auch SurA-SurA-Interaktionen vermitteln, die bisher anhand der verfügbaren kristallographischen Strukturdaten noch nicht identifiziert werden konnten.

5.3 Grundlagen zur Methodik der ortsspezifischen Quervernetzung von LamB-Polypeptiden an das periplasmatische Chaperon SurA

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Befunde und Hinweise aus früheren Arbeiten [Behrens *et al.*, 2001] weisen darauf hin, dass es innerhalb des SurA-Proteins möglicherweise noch weitere, eventuell auch unspezifische Substrat-Bindestellen geben könnte. Diese könnten sich möglicherweise im Bereich des Chaperon-Moduls SurANCt befinden, da dieses für die *in vivo*-Funktion der Chaperonaktivität hinreichend ist [Behrens *et al.*, 2001].

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen der ESR- und Fluoreszenzspektroskopie wurden Peptide von 12 - 14 Aminosäuren Länge verwendet (4.1.3 und 4.1.4.2). In diesen Versuchen konnte jedoch nicht für alle ausgewählten Peptide, die als SurA-bindende Peptide identifiziert worden waren [Hennecke *et al.*, 2005b; Hennecke, 2006], eine Interaktion mit der Parvulin-Domäne I des SurA-

DISKUSSION

Proteins nachgewiesen werden. Aus diesem Grund stellte sich dann die Frage: Interagieren weitere Bereiche von SurA (spezifisch) mit OMP-Polypeptiden?

Zur Klärung dieser Frage und um ggf. Bereiche innerhalb des SurA-Proteins zu identifizieren, die mit den OMP-Polypeptiden interagieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Methodik zur ortsspezifischen Quervernetzung des SurA-Proteins mit *in vitro* neu-synthetisierten Fragmenten des OMPs LamB in der Arbeitsgruppe eingeführt. Für die Detektion potentieller Interaktionsbereiche in SurA sollten die längeren LamB-Polypeptide *in vitro* in einem kombinierten Transkriptions-Translations-Ansatz in Anwesenheit von SurA synthetisiert und anschließend mittels ortsspezifischer Quervernetzung kovalent an das SurA-Protein gebunden werden.

Das OMP LamB wurde für dieses Verfahren ausgewählt, da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe die effiziente und spezifische Interaktion von SurA mit dem *in vitro* neu-synthetisierten OMP LamB, sowie mit LamB-Peptiden bereits gezeigt worden war [Behrens *et al.*, 2001; Hennecke, 2006]. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Bindung des LamB-Peptides Pep46 an die Parvulin-Domäne I von SurA nachgewiesen (siehe ESR-Spektroskopie).

Für die ortsspezifische Quervernetzung wurde das photoreaktive Aminosäure-Derivat *p*-Benzoylalanin (*p*BPA) ausgewählt [Kauer *et al.*, 1986; Dorman and Prestwich, 1994]. Die unnatürliche Aminosäure *p*BPA kann, unter Zuhilfenahme des orthogonalen Aminoacyl-tRNA Synthetase/Suppressor-tRNA-Paars, *in vivo* durch die Unterdrückung des *amber*-Stopp-Codons gezielt an spezifischen Positionen des zu analysierenden Proteins eingebaut werden [Young *et al.*, 2010]. Das Benzophenon von *p*BPA bildet unter UV-Bestrahlung kovalente Bindungen zu in direkter Nähe befindlichen Aminosäuren [Keutmann and Rubin, 1993]. Auf diese Weise können Protein-Polypeptid-Komplexe erhalten werden, die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden können. Die anschließende Detektion der Protein-Polypeptid-Komplexe kann entweder immunochemisch mittels *Western Blot* oder nach Einführung von ³⁵S-Methionin autoradiographisch erfolgen.

Diese Methodik der ortsspezifischen Quervernetzung durch die unnatürliche Aminosäure *p*BPA wurde ausgewählt, da diese bereits erfolgreich für die molekulare Analyse der Interaktion des cytoplasmatischen Chaperons Trigger Faktor (TF) von *E. coli* mit einer wachsenden Polypeptidkette verwendet worden war [Merz *et al.*, 2008]. Die Chaperonaktivität von TF wurde im C-Terminus nachgewiesen [Merz *et al.*, 2006] und diese C-terminale Haken-ähnliche Bindedomäne weist strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Chaperon-Modul von SurA auf [Ferbitz *et al.*, 2004; Ludlam *et al.*, 2004; Maier *et al.*, 2005; Stirling *et al.*, 2006]. Auch wenn die beiden Chaperone SurA und TF in unterschiedlichen Kompartimenten von *E. coli* aktiv sind (Periplasma versus Cytoplasma) und aufgrund dessen vermutlich eine andere Funktionsweise besitzen, wurde diese Methodik dennoch als erfolgversprechend bewertet, um die molekulare Interaktion von OMP-Polypeptiden mit SurA zu untersuchen.

5.3.1 Generierung von LamB-Polypeptid-Substraten für Quervernetzung mit SurA

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten ESR-spektroskopischen Untersuchungen wurde die Interaktion des LamB-Peptides Pep46 mit der Parvulin-Domäne I von SurA im Bereich der postulierten

DISKUSSION

Peptidbindestelle gezeigt. Aus diesem Grund wurde dieses Peptid als Ausgangspunkt für die Generierung der LamB-Polypeptide für die ortsspezifische Quervernetzung verwendet. Anhand der strukturellen Daten wurden zwei LamB-Polypeptide ausgewählt, die die Pep46-Sequenz enthalten (PL, 36 Aminosäuren bzw. LPL, 59 Aminosäuren). Dieses Vorgehen sollte ermöglichen, dass die verwendeten OMP-Polypeptide selektiv an die Parvulin-Domäne I von SurA binden und dadurch dann weitere Interaktionsbereiche innerhalb des SurA-Proteins identifiziert werden könnten.

Bedingt durch die Umstellung des bisher in der Arbeitsgruppe genutzten *in vitro*-Transkription/Translations-Kits auf das zellfreie PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB) mussten diverse Klonierungsschritte durchgeführt werden. Letztendlich wurden die zur Produktion der LamB-Polypeptide PL und LPL mittels *in vitro*-Transkription/Translation erforderlichen Plasmide generiert und die Polypeptide erfolgreich *in vitro* synthetisiert. Die Polypeptide PL und LPL wurden so generiert, dass sie über einen C-terminalen Strep-tag verfügen und somit ein direkter Nachweis der Polypeptide im *Western Blot* ermöglicht wurde.

Des Weiteren wurde das zur *in vitro*-Transkription/Translation von LamB-Gesamtprotein erforderliche Plasmid generiert und LamB ebenfalls erfolgreich detektiert. Der direkte Nachweis des LamB-Proteins erfolgte mittels Autoradiographie, da der in der Arbeitsgruppe verfügbare gegen LamB-gerichtete Antikörper nicht spezifisch reagiert (eigene Arbeiten und [Matern, 2007]). Da der immunochemische Nachweis der LamB-Polypeptide über den C-terminalen Strep-tag erfolgreich gewesen ist und um das Arbeiten mit radioaktiven Stoffen zu vermeiden, sollte für die weiteren Versuche das *lamB*-kodierende Plasmid ebenfalls mit einem Strep-tag versehen werden.

Um die Analyse und Identifikation von weiteren Interaktionsbereichen innerhalb von SurA fortzuführen, könnte man noch zusätzliche Polypeptide anderer Länge generieren, in denen das LamB-Peptid Pep46 N-terminal, zentral bzw. C-terminal lokalisiert ist. Zur Vervollständigung des Versuchsaufbaus und um die detektierten Interaktionspartner zu verifizieren, sollten in weiterführenden Versuchen auch Kontrollsubstrate eingesetzt werden. Diese Kontrollsubstrate könnten einerseits LamB-Polypeptide sein, die nicht über die Pep46-Sequenz verfügen und demnach vermutlich nicht selektiv an die Parvulin-Domäne I von SurA binden. Man könnte auch ein LamB-Polypeptid einsetzen, welches über keine spezifische SurA-Erkennungssequenz verfügt. Beispiele hierfür können den OMP-Peptid-Bibliotheken aus der Dissertation von [Hennecke, 2006] entnommen werden. Alternativ kann man als Kontrollsubstrat natürlich auch ein Polypeptid eines Proteins einsetzen, welches kein Substrat von SurA ist. Hierfür würde sich bspw. das Maltose-Bindeprotein MalE anbieten, welches nachweislich kein Substrat von SurA ist [Behrens *et al.*, 2001].

5.3.2 Generierung von SurA-*p*BPA-Proteinen für die ortsspezifische Quervernetzung von OMP-Polypeptiden

Für die Analyse der ortsspezifischen Quervernetzung von OMP-Polypeptiden an SurA wurden zunächst 5 Positionen im SurA-Protein ausgewählt, an denen die unnatürliche Aminosäure *p*BPA gezielt eingebaut werden sollte. Die Positionierung der ausgewählten Aminosäuren wurde auf Basis der verfügbaren SurA-

DISKUSSION

Strukturdaten getroffen. Die Aminosäurepositionen M231 und L239, die direkt an der Peptidbindung in der Parvulin-Domäne I von SurA beteiligt sind [Xu *et al.*, 2007], wurden als vielversprechende Kandidaten angesehen, um eine Quervernetzung des OMP-Polypeptides mit dem SurA-Protein zu erhalten. Vor allem, da die zunächst verwendeten LamB-Polypeptide PL und LPL über die Pep46-Sequenz verfügen. Für das Peptid Pep46 war eine Interaktion mit der Parvulin-Domäne I von SurA in der ESR-Spektroskopie nachgewiesen worden (4.1.3.3).

Die Auswahl der Positionen für die Quervernetzungsversuche wurde gemacht, bevor die vollständigen Ergebnisse der Versuche aus 4.1 und 4.2 vorlagen. Daher ist in der Nachbetrachtung die Position M231 vermutlich nur eingeschränkt geeignet, um eine Quervernetzung der OMP-Polypeptide mit der Parvulin-Domäne I von SurA zu erhalten. In den ESR-spektroskopischen Untersuchungen konnte keine Peptidinteraktion mit der Parvulin-Domäne I von SurA nachgewiesen werden, wenn die Position M231 zu Arginin mutiert worden war (SurAI_M231R, 4.1.3). In der weiteren Untersuchung der Interaktion des Peptides Pep46 mit SurAI_M231R in der Fluoreszenzspektroskopie wurde gezeigt, dass diese Variante nur noch sehr eingeschränkt in der Lage ist Peptid zu binden (4.1.4.2). Aus diesem Grund ist es möglich, dass auch die Einführung der unnatürlichen Aminosäure *p*BPA zu einer stark verringerten Bindungsfähigkeit des OMP-Polypeptids an die Parvulin-Domäne I führt und somit keine Quervernetzung zu sehen sein wird. Dies könnte dann auch als Bestätigung herangezogen werden, dass die verwendeten OMP-Polypeptide spezifisch mit der Parvulin-Domäne I interagieren.

Des Weiteren wurden die Positionen Y128 und E135 im N-Terminus von SurA für die Einführung des *amber*-Stopp-Codons ausgewählt. In früheren Arbeiten wurde zunächst vermutet, dass sich die Substratbindestelle in einem Spalt innerhalb der Kerndomäne SurANICt in einem Bereich mit vielen hydrophoben Aminosäuren befindet [Bitto and McKay, 2002]. Dieser Bereich liegt nach Bindung des artifiziellen Peptides PepC an die Parvulin-Domäne I relativ frei zugänglich vor [Xu *et al.*, 2007]. In unpublizierten Arbeiten der Arbeitsgruppe wurden hydrophobe Aminosäuren aus dem Spalt in SurANICt mutiert (u.a. auch Y128) und es wurde gezeigt, dass diese Mutationen keinen Effekt auf die SurA-Funktion haben (Dr. habil. S. Behrens-Kneip, persönliche Kommunikation). Da sich die Position Y128 direkt in dieser hydrophoben Tasche und sich die Position E135 in der Nähe davon befindet, wurden diese Positionen auch als vielversprechende Kandidaten für eine photoaktivierbare Quervernetzung der LamB-Polypeptide mit an diesen Stellen gezielt eingeführtem *p*BPA angesehen.

Die Position K86 befindet sich an der Unterseite des Chaperon-Moduls und sollte daher als Negativkontrolle genutzt werden. Die hier genannten Positionen innerhalb des SurA-Moleküls dienen für die Analyse der Identifizierung von Interaktionspartnern für neu-synthetisierte OMP-Polypeptide lediglich als Ausgangspunkt. Für weiterführende Studien sollten dann noch zusätzliche Positionen zugefügt und untersucht werden.

Die für die Produktion der entsprechenden SurA- bzw. SurAI-*p*BPA-Proteine notwendigen Plasmide wurden erfolgreich generiert. Erste Versuche zeigten, dass die Proteine nur in Anwesenheit von *p*BPA und des tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paares (kodiert auf dem Plasmid pEVOL-*p*BpF [Young *et al.*, 2010]; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Schultz, La Jolla, USA) in voller Länge

produziert werden. Die Proteine waren zudem *in vivo* funktionsfähig, da sie den letalen Phänotypen einer *surA skp*-Doppelmutante komplementierten. Somit konnte gezeigt werden, dass die Produktion der SurA-*pBPA*-Proteine für die Studien der ortsspezifischen Quervernetzung von OMP-Polypeptiden an SurA *in vivo* und *in vitro* möglich ist. In den bisher durchgeführten Versuchen konnten alle getesteten *pBPA*-Proteine produziert werden. Da jedoch einige der Varianten in noch relativ geringen Proteinausbeuten resultierten, ist eine weitere Optimierung der Produktionsbedingungen erforderlich.

5.3.3 Zusammenfassung und Ausblick der ortsspezifischen Quervernetzung

Die Methodik zur Produktion von SurA-*pBPA*- bzw. SurAI-*pBPA*-Proteinen konnte erfolgreich in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Zusätzlich konnten erste LamB-Polypeptid-Substrate generiert werden und stehen damit für weiterführende Analysen zur Verfügung.

Die bisherigen Versuche waren auf die ortsspezifische Quervernetzung mittels *in vitro* Transkription/Translation generierten LamB-Polypeptiden an das SurA-Protein ausgerichtet. Um diese Versuche weiterzuführen, könnten auch *in vivo*-Versuche zur photoaktivierbaren-Quervernetzung durchgeführt werden. Diese Methode wurde bspw. verwendet, um eine Quervernetzung der Proteine LolA und LolB zu erhalten [Okuda and Tokuda, 2009]. Hierbei wurden Zellen parallel mit allen notwendigen Vektoren transformiert, die Proteine im Anschluss direkt produziert und die Quervernetzung *in vivo* durch Bestrahlung mit UV-Licht herbeigeführt.

Die Durchführung der Versuche zur Quervernetzung der LamB-Polypeptide mit den SurA- bzw. SurAI-*pBPA*-Proteinen, die wertvolle Einblicke in die molekularen Prinzipien der Chaperonfunktion von SurA erwarten lassen, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr getätigt werden. Doch mit dieser Arbeit wurden die für die Analyse der SurA-Polypeptid-Interaktion durch ortsspezifische Quervernetzung benötigten Vorarbeiten geleistet und bieten somit vielversprechende Ansatzpunkte für weitere Studien.

Literaturverzeichnis

- Abe, S., Okutsu, T., Nakajima, H., Kakuda, N., Ohtsu, I., and Aono, R.** (2003). n-Hexane sensitivity of *Escherichia coli* due to low expression of *imp/ostA* encoding an 87 kDa minor protein associated with the outer membrane. *Microbiology* 149, 1265-1273.
- Alcock, F.H., Grossmann, J.G., Gentle, I.E., Likic, V.A., Lithgow, T., and Tokatlidis, K.** (2008). Conserved substrate binding by chaperones in the bacterial periplasm and the mitochondrial intermembrane space. *Biochem J* 409, 377-387.
- Altenbach, C., Flitsch, S.L., Khorana, H.G., and Hubbell, W.L.** (1989). Structural studies on transmembrane proteins. 2. Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines. *Biochemistry* 28, 7806-7812.
- Altenbach, C., Marti, T., Khorana, H.G., and Hubbell, W.L.** (1990). Transmembrane protein structure: spin labeling of bacteriorhodopsin mutants. *Science* 248, 1088-1092.
- Anderson, G.G., Palermo, J.J., Schilling, J.D., Roth, R., Heuser, J., and Hultgren, S.J.** (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 301, 105-107.
- Antonoaea, R., Furst, M., Nishiyama, K., and Muller, M.** (2008). The periplasmic chaperone PpiD interacts with secretory proteins exiting from the SecYEG translocon. *Biochemistry* 47, 5649-5656.
- Arie, J.P., Sassoon, N., and Betton, J.M.** (2001). Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 39, 199-210.
- Arora, A., Rinehart, D., Szabo, G., and Tamm, L.K.** (2000). Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. *The Journal of biological chemistry* 275, 1594-1600.
- Atkins, P.W., de Paula, J., Bär, M., Schleitzer, A., Heinisch, C.** (2006). *Physikalische Chemie, Vol 4* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).
- Banwell, C.N., McCash, E.M.** (1999). *Molekülspektroskopie: Ein Grundkurs* (München, R. Oldenbourg Verlag).
- Bard, A.J., Faulkner, L.R.** (2001). *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications, Second Edition* edn (Hoboken, John Wiley & Sons, Inc.).
- Basle, A., Rummel, G., Storici, P., Rosenbusch, J.P., and Schirmer, T.** (2006). Crystal structure of osmoprotectant OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J Mol Biol* 362, 933-942.
- Bayer, E., Goettsch, S., Mueller, J.W., Griewel, B., Guiberman, E., Mayr, L.M., and Bayer, P.** (2003). Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: insights into domain architecture and substrate binding. *The Journal of biological chemistry* 278, 26183-26193.
- Behrens-Kneip, S.** (2010). The role of SurA factor in outer membrane protein transport and virulence. *Int J Med Microbiol* 300, 421-428.
- Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F.X., and Gross, C.A.** (2001). The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *Embo J* 20, 285-294.
- Behrmann, M., Koch, H.G., Hengelage, T., Wieseler, B., Hoffschulte, H.K., and Muller, M.** (1998). Requirements for the translocation of elongation-arrested, ribosome-associated OmpA across the plasma membrane of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 273, 13898-13904.

LITERATURVERZEICHNIS

- Berliner, L.J., Grunwald, J., Hankovszky, H.O., and Hideg, K.** (1982). A novel reversible thiol-specific spin label: papain active site labeling and inhibition. *Anal Biochem* 119, 450-455.
- Bitto, E., and McKay, D.B.** (2002). Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins. *Structure* 10, 1489-1498.
- Bitto, E., and McKay, D.B.** (2003). The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. *The Journal of biological chemistry* 278, 49316-49322.
- Blondel, A., and Bedouelle, H.** (1991). Engineering the quaternary structure of an exported protein with a leucine zipper. *Protein Eng* 4, 457-461.
- Bodelon, G., Marin, E., and Fernandez, L.A.** (2009). Role of periplasmic chaperones and BamA (YaeT/Omp85) in folding and secretion of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of bacteriology* 191, 5169-5179.
- Bolin, K.A., Hanson, P., Wright, S.J., and Millhauser, G.L.** (1998). An NMR investigation of the conformational effect of nitroxide spin labels on Ala-rich helical peptides. *J Magn Reson* 131, 248-253.
- Bos, M.P., Robert, V., and Tommassen, J.** (2007). Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* 61, 191-214.
- Bos, M.P., Tefsen, B., Geurtsen, J., and Tommassen, J.** (2004). Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9417-9422.
- Braun, M., and Silhavy, T.J.** (2002). Imp/OstA is required for cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45, 1289-1302.
- Braun, V.** (1975). Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 415, 335-377.
- Buchanan, S.K.** (1999). Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr Opin Struct Biol* 9, 455-461.
- Buchner, J., Grallert, H., and Jakob, U.** (1998). Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods Enzymol* 290, 323-338.
- Bukau, B., and Horwich, A.L.** (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- Bush, G.L., Tassin, A.M., Friden, H., and Meyer, D.I.** (1991). Secretion in yeast. Purification and *in vitro* translocation of chemical amounts of prepro-alpha-factor. *The Journal of biological chemistry* 266, 13811-13814.
- Castanie-Cornet, M.P., Cam, K., and Jacq, A.** (2006). RcsF is an outer membrane lipoprotein involved in the RcsCDB phosphorelay signaling pathway in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 188, 4264-4270.
- CastilloKeller, M., and Misra, R.** (2003). Protease-deficient DegP suppresses lethal effects of a mutant OmpC protein by its capture. *Journal of bacteriology* 185, 148-154.
- Cavalier-Smith, T.** (2006). Rooting the tree of life by transition analyses. *Biol Direct* 1, 19.
- Chen, J., Song, J.L., Zhang, S., Wang, Y., Cui, D.F., and Wang, C.C.** (1999). Chaperone activity of DsbC. *The Journal of biological chemistry* 274, 19601-19605.

LITERATURVERZEICHNIS

- Chen, R., and Henning, U.** (1996). A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins. *Mol Microbiol* 19, 1287-1294.
- Chen, Y., Tai, P.C., and Sui, S.F.** (2007). The active ring-like structure of SecA revealed by electron crystallography: conformational change upon interaction with SecB. *J Struct Biol* 159, 149-153.
- Chin, J.W., Martin, A.B., King, D.S., Wang, L., and Schultz, P.G.** (2002). Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichiacoli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11020-11024.
- Clantin, B., Leyrat, C., Wohlkonig, A., Hodak, H., Ribeiro Ede, A., Jr., Martinez, N., Baud, C., Smet-Nocca, C., Villeret, V., Jacob-Dubuisson, F., et al.** (2010). Structure and plasticity of the peptidyl-prolyl isomerase Par27 of *Bordetella pertussis* revealed by X-ray diffraction and small-angle X-ray scattering. *J Struct Biol* 169, 253-265.
- Columbus, L., and Hubbell, W.L.** (2002). A new spin on protein dynamics. *Trends Biochem Sci* 27, 288-295.
- Cosloy, S.D., and Oishi, M.** (1973). Genetic transformation in *Escherichia coli* K12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 84-87.
- Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N., and Rosenbusch, J.P.** (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358, 727-733.
- Craig, E.A.** (1993). Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. *Science* 260, 1902-1903.
- Cross, B.C., Sinning, I., Luirink, J., and High, S.** (2009). Delivering proteins for export from the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 255-264.
- Dartigalongue, C., Missiakas, D., and Raina, S.** (2001). Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *The Journal of biological chemistry* 276, 20866-20875.
- Dartigalongue, C., and Raina, S.** (1998). A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J* 17, 3968-3980.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L.** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6640-6645.
- de Cock, H., Overeem, W., and Tommassen, J.** (1992). Biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. Evidence for multiple SecB-binding sites in the mature portion of the PhoE protein. *J Mol Biol* 224, 369-379.
- Denoncin, K., Vertommen, D., Paek, E., and Collet, J.F.** (2010). The protein-disulfide isomerase DsbC cooperates with SurA and DsbA in the assembly of the essential beta-barrel protein LptD. *The Journal of biological chemistry* 285, 29425-29433.
- DiRita, V.J.** (1992). Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 6, 451-458.
- DiRita, V.J., Parsot, C., Jander, G., and Mekalanos, J.J.** (1991). Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5403-5407.
- Doerrler, W.T., and Raetz, C.R.** (2005). Loss of outer membrane proteins without inhibition of lipid export in an *Escherichia coli* YaeT mutant. *The Journal of biological chemistry* 280, 27679-27687.

- Dorman, G., and Prestwich, G.D.** (1994). Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* 33, 5661-5673.
- Driessen, A.J., and Nouwen, N.** (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* 77, 643-667.
- Duplay, P., Bedouelle, H., Fowler, A., Zabin, I., Saurin, W., and Hofnung, M.** (1984). Sequences of the *malE* gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *The Journal of biological chemistry* 259, 10606-10613.
- Dutzler, R., Wang, Y.F., Rizkallah, P., Rosenbusch, J.P., and Schirmer, T.** (1996). Crystal structures of various maltooligosaccharides bound to maltoporin reveal a specific sugar translocation pathway. *Structure* 4, 127-134.
- Ellis, R.J., and Hartl, F.U.** (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol* 9, 102-110.
- Eppens, E.F., Nouwen, N., and Tommassen, J.** (1997). Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. *EMBO J* 16, 4295-4301.
- Ernst, F., Hoffschulte, H.K., Thome-Kromer, B., Swidersky, U.E., Werner, P.K., and Muller, M.** (1994). Precursor-specific requirements for SecA, SecB, and delta muH⁺ during protein export of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 269, 12840-12845.
- Eswaran, J., Koronakis, E., Higgins, M.K., Hughes, C., and Koronakis, V.** (2004). Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol* 14, 741-747.
- Fanghanel, J., and Fischer, G.** (2004). Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Front Biosci* 9, 3453-3478.
- Farrell, I.S., Toroney, R., Hazen, J.L., Mehl, R.A., and Chin, J.W.** (2005). Photo-cross-linking interacting proteins with a genetically encoded benzophenone. *Nature methods* 2, 377-384.
- Fekkes, P., van der Does, C., and Driessen, A.J.** (1997). The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J* 16, 6105-6113.
- Ferbitz, L., Maier, T., Patzelt, H., Bukau, B., Deuerling, E., and Ban, N.** (2004). Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature* 431, 590-596.
- Ferrieres, L., and Clarke, D.J.** (2003). The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol Microbiol* 50, 1665-1682.
- Fischer, G., and Aumuller, T.** (2003). Regulation of peptide bond *cis/trans* isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148, 105-150.
- Freifelder, D.** (1982). *Physical Biochemistry* (New York, W.H. Freeman and Company).
- Gatsos, X., Perry, A.J., Anwari, K., Dolezal, P., Wolyne, P.P., Likic, V.A., Purcell, A.W., Buchanan, S.K., and Lithgow, T.** (2008). Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 32, 995-1009.
- Gelis, I., Bonvin, A.M., Keramisanou, D., Koukaki, M., Gouridis, G., Karamanou, S., Economou, A., and Kalodimos, C.G.** (2007). Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell* 131, 756-769.

- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R., and Lithgow, T.** (2004). The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* 164, 19-24.
- Getz, E.B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R., and Selvin, P.R.** (1999). A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal Biochem* 273, 73-80.
- Giuseppe, P.O., Von Atzungen, M., Nascimento, A.L., Zanchin, N.I., and Guimaraes, B.G.** (2011). The crystal structure of the leptospiral hypothetical protein LIC12922 reveals homology with the periplasmic chaperone SurA. *J Struct Biol* 173, 312-322.
- Glauert, A.M., and Thornley, M.J.** (1969). The topography of the bacterial cell wall. *Annu Rev Microbiol* 23, 159-198.
- Gleiter, S., and Bardwell, J.C.** (2008). Disulfide bond isomerization in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1783, 530-534.
- Gothel, S.F., and Marahiel, M.A.** (1999). Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 55, 423-436.
- Hagan, C.L., Kim, S., and Kahne, D.** (2010). Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components. *Science* 328, 890-892.
- Hall, T.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Hammarström, P., Owenius, R., Martensson, L.G., Carlsson, U., and Lindgren, M.** (2001). High-resolution probing of local conformational changes in proteins by the use of multiple labeling: unfolding and self-assembly of human carbonic anhydrase II monitored by spin, fluorescent, and chemical reactivity probes. *Biophys J* 80, 2867-2885.
- Han, J.C., and Han, G.Y.** (1994). A procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal Biochem* 220, 5-10.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M.** (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Hennecke, F., Muller, A., Meister, R., Strelow, A., and Behrens, S.** (2005a). A ToxR-based two-hybrid system for the detection of periplasmic and cytoplasmic protein-protein interactions in *Escherichia coli*: minimal requirements for specific DNA binding and transcriptional activation. *Protein Eng Des Sel* 18, 477-486.
- Hennecke, G.** (2006). Zur Substratspezifität und Substratbindung des periplasmatischen Chaperons SurA aus *Escherichia coli*, *PhD* (Göttingen, Georg-August-Universität Göttingen).
- Hennecke, G., Nolte, J., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., and Behrens, S.** (2005b). The periplasmic chaperone SurA exploits two features characteristic of integral outer membrane proteins for selective substrate recognition. *The Journal of biological chemistry* 280, 23540-23548.
- Higgins, D.E., Nazareno, E., and DiRita, V.J.** (1992). The virulence gene activator ToxT from *Vibrio cholerae* is a member of the AraC family of transcriptional activators. *Journal of bacteriology* 174, 6974-6980.

- Hodak, H., Wohlkonig, A., Smet-Nocca, C., Drobecq, H., Wieruszkeski, J.M., Senechal, M., Landrieu, I., Loch, C., Jamin, M., and Jacob-Dubuisson, F. (2008). The peptidyl-prolyl isomerase and chaperone Par27 of *Bordetella pertussis* as the prototype for a new group of parvulins. *J Mol Biol* 376, 414-426.
- Hofmann, M.A., and Brian, D.A. (1991). Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony. *Biotechniques* 11, 30-31.
- Hope, I.A., and Struhl, K. (1987). GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *EMBO J* 6, 2781-2784.
- Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H. (1982). *Biophysik, 2. Auflage* edn (Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag).
- Horne, S.M., and Young, K.D. (1995). *Escherichia coli* and other species of the Enterobacteriaceae encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins. *Arch Microbiol* 163, 357-365.
- Hottenrott, S., Schumann, T., Pluckthun, A., Fischer, G., and Rahfeld, J.U. (1997). The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase. *The Journal of biological chemistry* 272, 15697-15701.
- Huang, Y.H., Ferrieres, L., and Clarke, D.J. (2006). The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Res Microbiol* 157, 206-212.
- Hubbell, W.L., Cafiso, D.S., and Altenbach, C. (2000). Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *Nat Struct Biol* 7, 735-739.
- Hubbell, W.L., Gross, A., Langen, R., and Lietzow, M.A. (1998). Recent advances in site-directed spin labeling of proteins. *Curr Opin Struct Biol* 8, 649-656.
- Ieva, R., and Bernstein, H.D. (2009). Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 19120-19125.
- Jansen, C., Heutink, M., Tommassen, J., and de Cock, H. (2000). The assembly pathway of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 267, 3792-3800.
- Johansen, J., Rasmussen, A.A., Overgaard, M., and Valentin-Hansen, P. (2006). Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins. *J Mol Biol* 364, 1-8.
- Justice, S.S., Hunstad, D.A., Harper, J.R., Duguay, A.R., Pinkner, J.S., Bann, J., Frieden, C., Silhavy, T.J., and Hultgren, S.J. (2005). Periplasmic peptidyl prolyl *cis-trans* isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 187, 7680-7686.
- Justice, S.S., Lauer, S.R., Hultgren, S.J., and Hunstad, D.A. (2006). Maturation of intracellular *Escherichia coli* communities requires SurA. *Infect Immun* 74, 4793-4800.
- Kadokura, H., Tian, H., Zander, T., Bardwell, J.C., and Beckwith, J. (2004). Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science* 303, 534-537.
- Kågedal, L. (1991). Chemical, Physical, and Chromatographic Properties of Superdex 75 Prep Grade and Superdex 200 Prep Grade Gelfiltration Media. *J Chromatogr* 537, 17-32.
- Kasher, M.S., Wakulchik, M., Cook, J.A., and Smith, M.C. (1993). One-step purification of recombinant human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein and its binding to the retinoblastoma gene product. *Biotechniques* 14, 630-641.

- Katzen, F., and Beckwith, J.** (2000). Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell* 103, 769-779.
- Kauer, J.C., Erickson-Viitanen, S., Wolfe, H.R., Jr., and DeGrado, W.F.** (1986). *p*-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide. *The Journal of biological chemistry* 261, 10695-10700.
- Kellermann, O., and Szmelcman, S.** (1974). Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Involvement of a "periplasmic" maltose binding protein. *Eur J Biochem* 47, 139-149.
- Kelly, S.M., Jess, T.J., and Price, N.C.** (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1751, 119-139.
- Kelly, S.M., Price, N.C.** (2006). Circular Dichroism to Study Protein Interactions. In Current Protocols in Protein Science (John Wiley & Sons, Inc.).
- Keutmann, H.T., and Rubin, D.A.** (1993). A subunit interaction site in human luteinizing hormone: identification by photoaffinity cross-linking. *Endocrinology* 132, 1305-1312.
- Kim, S., Malinverni, J.C., Sliz, P., Silhavy, T.J., Harrison, S.C., and Kahne, D.** (2007). Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* 317, 961-964.
- Kirby, T.L., Karim, C.B., and Thomas, D.D.** (2004). Electron paramagnetic resonance reveals a large-scale conformational change in the cytoplasmic domain of phospholamban upon binding to the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry* 43, 5842-5852.
- Klare, J.P., and Steinhoff, H.J.** (2009). Spin labeling EPR. *Photosynth Res* 102, 377-390.
- Kleerebezem, M., Heutink, M., and Tommassen, J.** (1995). Characterization of an *Escherichia coli* rotA mutant, affected in periplasmic peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase. *Mol Microbiol* 18, 313-320.
- Kleinschmidt, J.H.** (2003). Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* 60, 1547-1558.
- Koebnik, R., Locher, K.P., and Van Gelder, P.** (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 37, 239-253.
- Kolmar, H., Frisch, C., Kleemann, G., Gotze, K., Stevens, F.J., and Fritz, H.J.** (1994). Dimerization of Bence Jones proteins: linking the rate of transcription from an *Escherichia coli* promoter to the association constant of REIV. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375, 61-70.
- Kolmar, H., Hennecke, F., Gotze, K., Janzer, B., Vogt, B., Mayer, F., and Fritz, H.J.** (1995). Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures. *Embo J* 14, 3895-3904.
- Korndorfer, I.P., Dommel, M.K., and Skerra, A.** (2004). Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1015-1020.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C.** (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914-919.
- Kramer, R.A., Zandwijken, D., Egmond, M.R., and Dekker, N.** (2000). *In vitro* folding, purification and characterization of *Escherichia coli* outer membrane protease ompT. *Eur J Biochem* 267, 885-893.

- Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M., and Clausen, T.** (2002). Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature* 416, 455-459.
- Krojer, T., Sawa, J., Schafer, E., Saibil, H.R., Ehrmann, M., and Clausen, T.** (2008). Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* 453, 885-890.
- Kuhlewein, A., Voll, G., Hernandez Alvarez, B., Kessler, H., Fischer, G., Rahfeld, J.U., and Gemmecker, G.** (2004). Solution structure of *Escherichia coli* Par10: The prototypic member of the Parvulin family of peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases. *Protein Sci* 13, 2378-2387.
- Kurad, D., Jeschke, G., and Marsh, D.** (2003). Lipid membrane polarity profiles by high-field EPR. *Biophys J* 85, 1025-1033.
- Kweon, D.H., Kim, C.S., and Shin, Y.K.** (2003). Insertion of the membrane-proximal region of the neuronal SNARE coiled coil into the membrane. *The Journal of biological chemistry* 278, 12367-12373.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lakshmipathy, S.K., Tomic, S., Kaiser, C.M., Chang, H.C., Genevoux, P., Georgopoulos, C., Barral, J.M., Johnson, A.E., Hartl, F.U., and Etchells, S.A.** (2007). Identification of nascent chain interaction sites on trigger factor. *The Journal of biological chemistry* 282, 12186-12193.
- Lazar, S.W., and Kolter, R.** (1996). SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *Journal of bacteriology* 178, 1770-1773.
- Lecker, S.H., Driessen, A.J., and Wickner, W.** (1990). ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. *EMBO J* 9, 2309-2314.
- Li, H., and Thanassi, D.G.** (2009). Use of a combined cryo-EM and X-ray crystallography approach to reveal molecular details of bacterial pilus assembly by the chaperone/usher pathway. *Curr Opin Microbiol* 12, 326-332.
- Liu, J., and Walsh, C.T.** (1990). Peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase from *Escherichia coli*: a periplasmic homolog of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4028-4032.
- Lorenz, M.G., and Wackernagel, W.** (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* 58, 563-602.
- Ludlam, A.V., Moore, B.A., and Xu, Z.** (2004). The crystal structure of ribosomal chaperone trigger factor from *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13436-13441.
- Maier, T., Ferbitz, L., Deuerling, E., and Ban, N.** (2005). A cradle for new proteins: trigger factor at the ribosome. *Curr Opin Struct Biol* 15, 204-212.
- Malinverni, J.C., Werner, J., Kim, S., Sklar, J.G., Kahne, D., Misra, R., and Silhavy, T.J.** (2006). YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 61, 151-164.
- Marsh, D.** (2010). Electron spin resonance in membrane research: protein-lipid interactions from challenging beginnings to state of the art. *Eur Biophys J* 39, 513-525.
- Marsh, D., Kurad, D., and Livshits, V.A.** (2005). High-field spin-label EPR of lipid membranes. *Magn Reson Chem* 43 Spec no., S20-25.

LITERATURVERZEICHNIS

- Matern, Y.** (2007). *In vivo* Analyse des funktionellen Zusammenspiels periplasmatischer Faltungshelfer von *Escherichia coli*, *Diplom* (Göttingen, Georg-August-Universität Göttingen).
- Matern, Y., Barion, B., and Behrens-Kneip, S.** (2010). PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 10, 251.
- Mayer, M.P., Schroder, H., Rudiger, S., Paal, K., Laufen, T., and Bukau, B.** (2000). Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat Struct Biol* 7, 586-593.
- McCarty, J.S., Rudiger, S., Schonfeld, H.J., Schneider-Mergener, J., Nakahigashi, K., Yura, T., and Bukau, B.** (1996). Regulatory region C of the *E. coli* heat shock transcription factor, sigma32, constitutes a DnaK binding site and is conserved among eubacteria. *J Mol Biol* 256, 829-837.
- McHaourab, H.S., Lietzow, M.A., Hideg, K., and Hubbell, W.L.** (1996). Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. Correlation with protein structure and dynamics. *Biochemistry* 35, 7692-7704.
- Merz, F., Boehringer, D., Schaffitzel, C., Preissler, S., Hoffmann, A., Maier, T., Rutkowska, A., Lozza, J., Ban, N., Bukau, B., et al.** (2008). Molecular mechanism and structure of Trigger Factor bound to the translating ribosome. *EMBO J* 27, 1622-1632.
- Merz, F., Hoffmann, A., Rutkowska, A., Zachmann-Brand, B., Bukau, B., and Deuerling, E.** (2006). The C-terminal domain of *Escherichia coli* trigger factor represents the central module of its chaperone activity. *The Journal of biological chemistry* 281, 31963-31971.
- Messens, J., and Collet, J.F.** (2006). Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1050-1062.
- Miller, J.H.** (1972). *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Miller, V.L., and Mekalanos, J.J.** (1984). Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 3471-3475.
- Millhauser, G.L., Fiori, W.R., and Miick, S.M.** (1995). Electron spin labels. *Methods Enzymol* 246, 589-610.
- Misra, R.** (2007). First glimpse of the crystal structure of YaeT's POTRA domains. *ACS Chem Biol* 2, 649-651.
- Missiakas, D., Betton, J.M., and Raina, S.** (1996). New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol Microbiol* 21, 871-884.
- Mogensen, J.E., and Otzen, D.E.** (2005). Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol* 57, 326-346.
- Mortimer, C.E.** (2001). *Chemie. Das Basiswissen der Chemie.*, 7 edn (Stuttgart, Thieme).
- Muhradt, P.F., and Golecki, J.R.** (1975). Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of *Salmonella typhimurium*. *Eur J Biochem* 51, 343-352.
- Mullineaux, C.W., Nenninger, A., Ray, N., and Robinson, C.** (2006). Diffusion of green fluorescent protein in three cell environments in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 188, 3442-3448.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.

- Mulvey, M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, W.C., Heuser, J., and Hultgren, S.J.** (1998). Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282, 1494-1497.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., and Yamaguchi, A.** (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443, 173-179.
- Namanja, A.T., Peng, T., Zintsmaster, J.S., Elson, A.C., Shakour, M.G., and Peng, J.W.** (2007). Substrate recognition reduces side-chain flexibility for conserved hydrophobic residues in human Pin1. *Structure* 15, 313-327.
- Nelson, M., and McClelland, M.** (1992). Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol* 216, 279-303.
- Nikaido, H.** (1994). Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *The Journal of biological chemistry* 269, 3905-3908.
- Nikaido, H.** (1996). Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* 178, 5853-5859.
- Nikaido, H.** (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 593-656.
- O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Stafford, W.F., 3rd, and Kim, P.S.** (1989). Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science* 245, 646-648.
- Oh, K.J., Zhan, H., Cui, C., Altenbach, C., Hubbell, W.L., and Collier, R.J.** (1999). Conformation of the diphtheria toxin T domain in membranes: a site-directed spin-labeling study of the TH8 helix and TL5 loop. *Biochemistry* 38, 10336-10343.
- Okuda, S., and Tokuda, H.** (2009). Model of mouth-to-mouth transfer of bacterial lipoproteins through inner membrane LolC, periplasmic LolA, and outer membrane LolB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5877-5882.
- Owinius, R., Osterlund, M., Lindgren, M., Svensson, M., Olsen, O.H., Persson, E., Freskgard, P.O., and Carlsson, U.** (1999). Properties of spin and fluorescent labels at a receptor-ligand interface. *Biophys J* 77, 2237-2250.
- Paetzl, M., Dalbey, R.E., and Strynadka, N.C.** (2002). Crystal structure of a bacterial signal peptidase apoenzyme: implications for signal peptide binding and the Ser-Lys dyad mechanism. *The Journal of biological chemistry* 277, 9512-9519.
- Parsy, C.B., Chapman, C.J., Barnes, A.C., Robertson, J.F., and Murray, A.** (2007). Two-step method to isolate target recombinant protein from co-purified bacterial contaminant SlyD after immobilised metal affinity chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 853, 314-319.
- Patel, G.J., and Kleinschmidt, J.H.** (2013). The lipid bilayer-inserted membrane protein BamA of *Escherichia coli* facilitates insertion and folding of outer membrane protein A from its complex with Skp. *Biochemistry* 52, 3974-3986.
- Patzelt, H., Rudiger, S., Brehmer, D., Kramer, G., Vorderwulbecke, S., Schaffitzel, E., Waitz, A., Hesterkamp, T., Dong, L., Schneider-Mergener, J., et al.** (2001). Binding specificity of *Escherichia coli* trigger factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14244-14249.
- Pautsch, A., and Schulz, G.E.** (1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol* 5, 1013-1017.

- Pfeiffer, M., Rink, T., Gerwert, K., Oesterhelt, D., and Steinhoff, H.J.** (1999). Site-directed spin-labeling reveals the orientation of the amino acid side-chains in the E-F loop of bacteriorhodopsin. *J Mol Biol* 287, 163-171.
- Purdy, G.E., Fisher, C.R., and Payne, S.M.** (2007). IcsA surface presentation in *Shigella flexneri* requires the periplasmic chaperones DegP, Skp, and SurA. *Journal of bacteriology* 189, 5566-5573.
- Qi, H.Y., Hyndman, J.B., and Bernstein, H.D.** (2002). DnaK promotes the selective export of outer membrane protein precursors in SecA-deficient *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 277, 51077-51083.
- Qin, Z., and Squier, T.C.** (2001). Calcium-dependent stabilization of the central sequence between Met(76) and Ser(81) in vertebrate calmodulin. *Biophys J* 81, 2908-2918.
- Raetz, C.R., and Whitfield, C.** (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71, 635-700.
- Rahfeld, J.U., Rucknagel, K.P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K., and Fischer, G.** (1994a). Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS letters* 352, 180-184.
- Rahfeld, J.U., Schierhorn, A., Mann, K., and Fischer, G.** (1994b). A novel peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS letters* 343, 65-69.
- Raivio, T.L.** (2005). Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol* 56, 1119-1128.
- Ramm, K., and Pluckthun, A.** (2000). The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl *cis,trans*-isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity *in vitro*. *The Journal of biological chemistry* 275, 17106-17113.
- Ramm, K., and Pluckthun, A.** (2001). High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric *E. coli* peptidyl-prolyl-isomerase FkpA. *J Mol Biol* 310, 485-498.
- Randall, L.L., and Hardy, S.J.** (2002). SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *Cell Mol Life Sci* 59, 1617-1623.
- Ranganathan, R., Lu, K.P., Hunter, T., and Noel, J.P.** (1997). Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* 89, 875-886.
- Rapoport, T.A.** (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450, 663-669.
- Rhodijs, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J., and Gross, C.A.** (2006). Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol* 4, e2.
- Richarme, G.** (1982). Associative properties of the *Escherichia coli* galactose binding protein and maltose binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 105, 476-481.
- Rizzitello, A.E., Harper, J.R., and Silhavy, T.J.** (2001). Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 183, 6794-6800.
- Robert, V., Volokhina, E.B., Senf, F., Bos, M.P., Van Gelder, P., and Tommassen, J.** (2006). Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol* 4, e377.

- Rogers, H.J., Perkins, H.R., Ward, J.B.** (1980). *Microbial Cell Walls and Membranes* (London, Chapman and Hall).
- Roof, W.D., Horne, S.M., Young, K.D., and Young, R.** (1994). *shyD*, a host gene required for phi X174 lysis, is related to the FK506-binding protein family of peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerases. *The Journal of biological chemistry* 269, 2902-2910.
- Rouviere, P.E., and Gross, C.A.** (1996). SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* 10, 3170-3182.
- Ruiz-Perez, F., Henderson, I.R., Leyton, D.L., Rossiter, A.E., Zhang, Y., and Nataro, J.P.** (2009). Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *Journal of bacteriology* 191, 6571-6583.
- Ruiz, N., Gronenberg, L.S., Kahne, D., and Silhavy, T.J.** (2008). Identification of two inner-membrane proteins required for the transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5537-5542.
- Ruiz, N., Kahne, D., and Silhavy, T.J.** (2009). Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery. *Nat Rev Microbiol* 7, 677-683.
- Ruiz, N., and Silhavy, T.J.** (2005). Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr Opin Microbiol* 8, 122-126.
- Saul, F.A., Arie, J.P., Vulliez-le Normand, B., Kahn, R., Betton, J.M., and Bentley, G.A.** (2004). Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a *cis/trans* peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J Mol Biol* 335, 595-608.
- Sauri, A., Soprova, Z., Wickstrom, D., de Gier, J.W., Van der Schors, R.C., Smit, A.B., Jong, W.S., and Luirink, J.** (2009). The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiology* 155, 3982-3991.
- Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F., and Rosenbusch, J.P.** (1995). Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* 267, 512-514.
- Schlegel, H.G.** (1992). *Allgemeine Mikrobiologie* (Stuttgart, Georg Thieme Verlag).
- Scholz, C., Rahfeld, J., Fischer, G., and Schmid, F.X.** (1997). Catalysis of protein folding by parvulin. *J Mol Biol* 273, 752-762.
- Schulze-Gahmen, U., Aono, S., Chen, S., Yokota, H., Kim, R., and Kim, S.H.** (2005). Structure of the hypothetical Mycoplasma protein MPN555 suggests a chaperone function. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61, 1343-1347.
- Schwalm, J., Mahoney, T.F., Soltes, G.R., and Silhavy, T.J.** (2013). Role for Skp in LptD assembly in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 195, 3734-3742.
- Schwartz, M., Kellermann, O., Szmelcman, S., and Hazelbauer, G.L.** (1976). Further studies on the binding of maltose to the maltose-binding protein of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 71, 167-170.
- Shen, Q.T., Bai, X.C., Chang, L.F., Wu, Y., Wang, H.W., and Sui, S.F.** (2009). Bowl-shaped oligomeric structures on membranes as DegP's new functional forms in protein quality control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 4858-4863.
- Shimizu, Y., Kanamori, T., and Ueda, T.** (2005). Protein synthesis by pure translation systems. *Methods (San Diego, Calif)* 36, 299-304.

- Shouldice, S.R., Heras, B., Jarrott, R., Sharma, P., Scanlon, M.J., and Martin, J.L.** (2010). Characterization of the DsbA oxidative folding catalyst from *Pseudomonas aeruginosa* reveals a highly oxidizing protein that binds small molecules. *Antioxid Redox Signal* 12, 921-931.
- Simpson, R.J., Adams, P.D., Golemis, E.A.** (2008). Basic Methods in Protein Purification: A Laboratory Manual, *Lab Manual* edn (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Skerra, A.** (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131-135.
- Sklar, J.G., Wu, T., Gronenberg, L.S., Malinverni, J.C., Kahne, D., and Silhavy, T.J.** (2007a). Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6400-6405.
- Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D., and Silhavy, T.J.** (2007b). Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 21, 2473-2484.
- Sperandio, P., Lau, F.K., Carpentieri, A., De Castro, C., Molinaro, A., Deho, G., Silhavy, T.J., and Polissi, A.** (2008). Functional analysis of the protein machinery required for transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 190, 4460-4469.
- Spiess, C., Beil, A., and Ehrmann, M.** (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97, 339-347.
- Steinhoff, H.J.** (1988). A simple method for determination of rotational correlation times and separation of rotational and polarity effects from EPR spectra of spin-labeled biomolecules in a wide correlation time range. *J Biochem Biophys Methods* 17, 237-247.
- Steinhoff, H.J.** (2004). Inter- and intra-molecular distances determined by EPR spectroscopy and site-directed spin labeling reveal protein-protein and protein-oligonucleotide interaction. *Biol Chem* 385, 913-920.
- Stirling, P.C., Bakhoun, S.F., Feigl, A.B., and Leroux, M.R.** (2006). Convergent evolution of clamp-like binding sites in diverse chaperones. *Nat Struct Mol Biol* 13, 865-870.
- Stirling, P.C., Lundin, V.F., and Leroux, M.R.** (2003). Getting a grip on non-native proteins. *EMBO Rep* 4, 565-570.
- Stone, T.J., Buckman, T., Nordio, P.L., and McConnell, H.M.** (1965). Spin-labeled biomolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54, 1010-1017.
- Stryer, L.** (1965). The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J Mol Biol* 13, 482-495.
- Stymest, K.H., and Klappa, P.** (2008). The periplasmic peptidyl prolyl *cis-trans* isomerases PpiD and SurA have partially overlapping substrate specificities. *FEBS J* 275, 3470-3479.
- Svensson, M., Jonasson, P., Freskgard, P.O., Jonsson, B.H., Lindgren, M., Martensson, L.G., Gentile, M., Boren, K., and Carlsson, U.** (1995). Mapping the folding intermediate of human carbonic anhydrase II. Probing substructure by chemical reactivity and spin and fluorescence labeling of engineered cysteine residues. *Biochemistry* 34, 8606-8620.
- Sydenham, M., Douce, G., Bowe, F., Ahmed, S., Chatfield, S., and Dougan, G.** (2000). *Salmonella enterica* serovar typhimurium *surA* mutants are attenuated and effective live oral vaccines. *Infect Immun* 68, 1109-1115.

- Symmons, M.F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V.** (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 7173-7178.
- Tamayo, R., Ryan, S.S., McCoy, A.J., and Gunn, J.S.** (2002). Identification and genetic characterization of PmrA-regulated genes and genes involved in polymyxin B resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* 70, 6770-6778.
- Tamm, L.K., Hong, H., and Liang, B.** (2004). Folding and assembly of beta-barrel membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1666, 250-263.
- Tikhonova, E.B., and Zgurskaya, H.I.** (2004). AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex. *The Journal of biological chemistry* 279, 32116-32124.
- Tokuda, H.** (2009). Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 465-473.
- Tormo, A., Almiron, M., and Kolter, R.** (1990). *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *Journal of bacteriology* 172, 4339-4347.
- Ureta, A.R., Endres, R.G., Wingreen, N.S., and Silhavy, T.J.** (2007). Kinetic analysis of the assembly of the outer membrane protein LamB in *Escherichia coli* mutants each lacking a secretion or targeting factor in a different cellular compartment. *Journal of bacteriology* 189, 446-454.
- Vaara, M.** (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 56, 395-411.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A.** (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36-44.
- Vertommen, D., Ruiz, N., Leverrier, P., Silhavy, T.J., and Collet, J.F.** (2009). Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *Proteomics* 9, 2432-2443.
- Vogel, J., and Papenfort, K.** (2006). Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol* 9, 605-611.
- Vollmer, W., and Holtje, J.V.** (2001). Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 4, 625-633.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M., and Tommassen, J.** (2003). Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* 299, 262-265.
- Vuong, P., Bennion, D., Mantei, J., Frost, D., and Misra, R.** (2008). Analysis of YfgL and YaeT interactions through bioinformatics, mutagenesis, and biochemistry. *Journal of bacteriology* 190, 1507-1517.
- Walton, T.A., Sandoval, C.M., Fowler, C.A., Pardi, A., and Sousa, M.C.** (2009). The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1772-1777.
- Walton, T.A., and Sousa, M.C.** (2004). Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol Cell* 15, 367-374.
- Wandersman, C., Schwartz, M., and Ferenci, T.** (1979). *Escherichia coli* mutants impaired in maltodextrin transport. *Journal of bacteriology* 140, 1-13.
- Wang, W., and Malcolm, B.A.** (1999). Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* 26, 680-682.

LITERATURVERZEICHNIS

- Webb, H.M., Ruddock, L.W., Marchant, R.J., Jonas, K., and Klappa, P.** (2001). Interaction of the periplasmic peptidylprolyl *cis-trans* isomerase SurA with model peptides. The N-terminal region of SurA is essential and sufficient for peptide binding. *The Journal of biological chemistry* 276, 45622-45627.
- Wegener, A.A.** (2000). Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Lichtrezeptors pSRII mit seinem Transducerprotein pHtrII., *PhD* (Dortmund, Universität Dortmund).
- Wegener, A.A., Klare, J.P., Engelhard, M., and Steinhoff, H.J.** (2001). Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *EMBO J* 20, 5312-5319.
- Weininger, U., Jakob, R.P., Kovermann, M., Balbach, J., and Schmid, F.X.** (2010). The prolyl isomerase domain of PpiD from *Escherichia coli* shows a parvulin fold but is devoid of catalytic activity. *Protein Sci* 19, 6-18.
- Werner, J., Augustus, A.M., and Misra, R.** (2003). Assembly of TolC, a structurally unique and multifunctional outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 185, 6540-6547.
- Wimley, W.C.** (2003). The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol* 13, 404-411.
- Wright, K.J., Seed, P.C., and Hultgren, S.J.** (2007). Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol* 9, 2230-2241.
- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T.J., and Kahne, D.** (2005). Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* 121, 235-245.
- Wu, T., McCandlish, A.C., Gronenberg, L.S., Chng, S.S., Silhavy, T.J., and Kahne, D.** (2006). Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11754-11759.
- Wulfing, C., Lombardero, J., and Pluckthun, A.** (1994). An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *The Journal of biological chemistry* 269, 2895-2901.
- Wulfing, C., and Pluckthun, A.** (1994). Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 12, 685-692.
- Xu, X., Wang, S., Hu, Y.X., and McKay, D.B.** (2007). The periplasmic bacterial molecular chaperone SurA adapts its structure to bind peptides in different conformations to assert a sequence preference for aromatic residues. *J Mol Biol* 373, 367-381.
- Yaffe, M.B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X.Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J.U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M.W., Fischer, G., et al.** (1997). Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* 278, 1957-1960.
- Young, T.S., Ahmad, I., Yin, J.A., and Schultz, P.G.** (2010). An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in *E. coli*. *J Mol Biol* 395, 361-374.
- Zimmer, J., Nam, Y., and Rapoport, T.A.** (2008). Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature* 455, 936-943.

Anhang

Detail-Auswertung der CD-Spektroskopie (analysiert durch PD Dr. J. Kleinschmidt und Arbeitsgruppe, Universität Konstanz, heute Kassel)



Results in detail

wt-SurA P1 domain

Provencher & Glockner Method: Reference set 4

NRMSD:0.123

Helix segments per 100 residues: 2.468

Ave helix length per segment: 7.319

Strand segments per 100 residues: 5.355

Ave strand length per segment: 5.399

Result	Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total
1	0.123	0.123	0.167	0.101	0.212	0.274	1
2	0.082	0.099	0.182	0.107	0.227	0.304	1.001

1: Closest matching solution with all proteins
2: Average of all matching solutions

All matching solutions:

Solution	Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total
1	0.089	0.106	0.183	0.107	0.234	0.281	1
2	0.080	0.099	0.183	0.106	0.237	0.295	1
3	0.077	0.099	0.183	0.106	0.238	0.297	1
4	0.079	0.089	0.185	0.108	0.230	0.309	1
5	0.077	0.090	0.188	0.109	0.228	0.308	1
6	0.076	0.090	0.190	0.110	0.230	0.304	1
7	0.080	0.098	0.176	0.107	0.229	0.311	1.001
8	0.083	0.100	0.181	0.106	0.220	0.310	1
9	0.082	0.100	0.179	0.106	0.221	0.311	0.999
10	0.089	0.103	0.171	0.103	0.220	0.315	1.001
11	0.089	0.112	0.183	0.110	0.205	0.301	1



Results in detail

mutant SurA P1 domain M231C

Provencher & Glockner Method: Reference set 4

NRMSD:0.110

Helix segments per 100 residues: 2.225

Ave helix length per segment: 6.679

Strand segments per 100 residues: 5.483

Ave strand length per segment: 5.774

Result	Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total
1	0.096	0.104	0.194	0.105	0.207	0.294	1
2	0.060	0.089	0.207	0.110	0.219	0.316	1.001

1: Closest matching solution with all proteins
2: Average of all matching solutions

All matching solutions:

Solution	Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total
1	0.077	0.089	0.203	0.111	0.218	0.302	1
2	0.073	0.089	0.207	0.111	0.215	0.305	1
3	0.074	0.090	0.207	0.111	0.214	0.305	1.001
4	0.073	0.090	0.209	0.111	0.212	0.305	1
5	0.072	0.091	0.206	0.110	0.215	0.306	1
6	0.072	0.090	0.206	0.110	0.216	0.305	0.999
7	0.071	0.088	0.206	0.111	0.220	0.304	1
8	0.071	0.088	0.206	0.111	0.220	0.304	1
9	0.070	0.086	0.205	0.111	0.220	0.309	1.001
10	0.069	0.082	0.204	0.113	0.222	0.311	1.001
11	0.065	0.081	0.208	0.112	0.232	0.302	1
12	0.065	0.082	0.208	0.113	0.231	0.302	1.001
13	0.065	0.081	0.187	0.108	0.236	0.323	1
14	0.061	0.089	0.187	0.109	0.244	0.311	1.001
15	0.053	0.085	0.203	0.110	0.240	0.309	1
16	0.054	0.074	0.206	0.112	0.232	0.321	0.999
17	0.041	0.071	0.203	0.112	0.241	0.332	1
18	0.038	0.071	0.202	0.112	0.242	0.335	1
19	0.035	0.070	0.203	0.111	0.240	0.341	1
20	0.039	0.073	0.194	0.109	0.241	0.345	1.001
21	0.043	0.088	0.219	0.117	0.210	0.324	1.001
22	0.045	0.088	0.216	0.116	0.210	0.325	1
23	0.060	0.099	0.194	0.104	0.209	0.334	1
24	0.060	0.100	0.197	0.104	0.206	0.333	1
25	0.063	0.106	0.213	0.104	0.191	0.324	1.001
26	0.057	0.115	0.219	0.107	0.191	0.312	1.001
27	0.056	0.112	0.194	0.106	0.215	0.317	1
28	0.063	0.106	0.192	0.104	0.219	0.316	1
29	0.045	0.104	0.264	0.098	0.189	0.299	0.999
30	0.058	0.092	0.241	0.112	0.178	0.319	1

ANHANG

Aminosäuresequenz von SurA mit farbiger Markierung der unterschiedlichen Domänen

SurA.pep Length

1 MKNWKTL~~LLG~~ IAMIAN~~TSFA~~ APQVV~~DKVAA~~ VV~~NNGVVLES~~ DVDGL~~MQSVK~~

51 LNAAQAR~~QQL~~ PDDAT~~LRHQI~~ MERLIM~~DQII~~ LQMGQ~~KMGVK~~ ISDEQ~~LDQAI~~

101 ANIAKQ~~NNMT~~ LDQMR~~SRLAY~~ DGLNY~~NTYRN~~ QIRKEM~~IISE~~ VRNNE~~VRRRI~~

151 TILPQE~~EVESL~~ AQQVG~~NQND~~ STELN~~LSHIL~~ IPLPEN~~PTSD~~ QVNEA~~ESQAR~~

201 AIVDQAR~~NGA~~ DFGKLA~~IAHS~~ ADQQAL~~NGGQ~~ MGWGRI~~QELP~~ GIFAQ~~ALSTA~~

251 KKGDIV~~GPIR~~ SGVGF~~HILKV~~ NDLRGE~~SKNI~~ SVTEV~~HARHI~~ LLKPSP~~IMTD~~

301 EQARVK~~LEQI~~ AADIKS~~GKTT~~ FAAAA~~KEFSQ~~ DPGSAN~~QGGD~~ LGWATP~~DIFD~~

351 PAFRDAL~~TRL~~ NKGQMS~~APVH~~ SSFGWH~~LIEL~~ LDTRN~~VDKTD~~ AAQK~~DRAYRM~~

401 LMNRKF~~SSEA~~ ASWMQE~~QRAS~~ AYVKIL~~SN~~

rot= Signalpeptid
grün = N-terminale Domäne
blau = PPIase-Domäne I
Schwarz = PPIase-Domäne II
orange = C-Terminus

Aminosäuresequenz der isolierten Parvulin-Domäne SurAI (inklusive C-terminalem His-tag)

MNLSHILIPLENPTSDQVNEAESQARAIVDQARNGADFGKLAIAHSADQQALNGGQMGWG
RIQELPGIFAQALSTAKKGDIVGPIRSGVGFHILKVNDLRGESRSHHHHHH

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
Ap	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BAM	<i>β-barrel assembly machinery</i>
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
ca.	<i>circa</i>
Cm	Chloramphenicol
CR	cytoplasmatischer Raum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenparamagnetische Resonanz
<i>et al.</i>	<i>et alias</i> , und andere
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Gauß
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
HRP	Merettich-Peroxidase
ICB	<i>intracellular bacterial community</i>
IM	<i>inner membrane</i> , innere Membran
IMAC	immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kb	kilo-Base (1.000 bp)
kDa	kilo-Dalton
Km	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli (10 ⁻³)
M	Molar
max.	maximal

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
n	nano (10^{-9})
OD _{Wellenlänge [nm]}	optische Dichte
OM	<i>outer membrane</i> , äußere Membran
OMP	<i>outer membrane protein</i> , Außenmembranprotein
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	pico-mol
PPlase	peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> Isomerase
PR	periplasmatischer Raum
QC-PCR	<i>quick change mutagenesis</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecyl-Sulfat
sek	Sekunde
T_A	Annealingtemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tc	Tetracyclin
TCEP	Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid
T_M	Schmelztemperatur
TF	Trigger Faktor
U	Units (Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra Violett
V	Volt
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
x g	ein Vielfaches der Erdbeschleunigung (g)
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

Herrn PD Dr. Klaus Heuner danke ich für die Übernahme der universitären Betreuung meiner Doktorarbeit in Berlin und die angeregten Diskussionen während der regelmäßigen Gruppenseminare am Robert-Koch-Institut.

Frau Dr. habil. Susanne Behrens-Kneip danke ich recht herzlich für die Möglichkeit an dem spannenden SurA-Projekt weiter zu arbeiten und tiefere Einblicke in den Mechanismus dieses periplasmatischen Chaperons zu erhalten. Sie war jederzeit für Diskussionen offen und hat mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Diese Arbeit war Bestandteil eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projekts von Dr. habil. Susanne Behrens-Kneip.

Dr. Derek Marsh und Frau Brigitta Angerstein vom Max-Planck-Institut in Göttingen danke ich für Ihre Unterstützung und Kooperation bei der ESR-Spektroskopie. Ohne Dereks Expertise und Gittas Tee und Gesellschaft wären die langwierigen ESR-Messungen wohl nicht möglich gewesen.

PD Dr. Jörg Kleinschmidt und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Durchführung und Interpretation der CD-Spektroskopie (Universität Konstanz, heute Kassel).

An dieser Stelle möchte ich auch meinen ehemaligen Kollegen vom Institut für Mikrobiologie und Genetik (Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie) in Göttingen danken, die mich in meiner Zeit dort so tatkräftig unterstützt haben und immer ein offenes Ohr hatten.

Großer Dank gilt natürlich auch den Mitgliedern meiner ehemaligen Arbeitsgruppe P26 am Robert-Koch-Institut Berlin: Dr. Eva Schunder, Dr. Tino Schulz, Kerstin Rydzewski, Dr. Vroni Herrmann, Dr. Monika Lautner, Nicole Janitzek, Nadja Bier und David Wagner. Meine lieben Kollegen waren für mich ein steter Quell an Inspiration, Arbeitsmotivation und Freundschaften, welche auch über diese Arbeit hinaus Bestand haben werden.

Weiterhin danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die immer an mich geglaubt haben und stets mit guten Ratschlägen zur Seite standen. Im Besonderen danke ich hierbei meinen Eltern und meiner Oma, die das leider nicht mehr erleben kann, für ihre Liebe, Geduld und Unterstützung.

Der größte Dank gebührt meinem Verlobten Thorsten Werstler, der mich in allen Belangen unterstützt, allen Launen getrotzt und ab und zu auch einen Tritt in die richtige Richtung gegeben hat.

Publikationsliste

Veröffentlichung:

Matern, Y, Barion, B, Behrens-Kneip, S: Ppid is a player in the network of periplasmic chaperones in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* 2010 10:251.

Posterbeiträge auf Tagungen:

Matern, Y, Behrens-Kneip S: Genetic analysis of the functional interplay between SurA, Skp and PpiD in the maturation of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biospectrum, Abstracts Annual meeting of the VAAM* 2007.

Matern, Y, Barion, B, Behrens-Kneip S: The *Escherichia coli* peptidyl-prolyl isomerase PpiD – the periplasmic trigger factor for newly-translocated proteins? *Biospectrum, Abstracts Annual meeting of the VAAM* 2009.

Matern, Y, Marsh, D, Behrens-Kneip, S: Structure-function analysis of the periplasmic chaperone SurA of *Escherichia coli*. *Biospectrum, Abstracts Annual meeting of the VAAM* 2009.

Matern, Y, Behrens-Kneip, S: Towards identification of substrate interaction sites on the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA. *Biospectrum, Abstracts Annual meeting of the VAAM* 2010.

Erklärung

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Humboldt-Universität zu Berlin (2005) erkläre ich hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer darstellt und die benutzten Hilfsmittel, sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, 2014

(Yvonne Werstler, geb. Matern)