

Proteintransport in *E. coli*:
Untersuchung der Konformationsänderungen des
Chaperons SecB durch Bindung an das
Modellsubstrat *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*
(BPTI) mit Hilfe der EPR-Spektroskopie

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern

zur Verleihung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte

DISSERTATION

(D 386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Michaela Maria Haimann

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

Wissenschaftliche Aussprache:

08. März 2012

Meinen lieben Eltern

Die Natur ist die beste Führerin des Lebens.

Marcus Tullius Cicero

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum November 2006 bis Dezember 2011 im Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie, der Technischen Universität Kaiserslautern.

Herrn Prof. Dr. W. E. Trommer danke ich für die interessante und abwechslungsreiche Aufgabenstellung sowie für die Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit. Mein ganz besonderer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 08. März 2012

Promotionskommission:

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Werner Thiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

2. Berichterstatter: PD Dr. Gerd Klock

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Theorie	1
1.1	Molekulare Helfer: Die Chaperone	1
1.2	Transport integraler und sekretorischer Proteine	4
1.2.1	Signalsequenzen	4
1.2.2	Der Tat-Exportweg	5
1.2.3	Der Sec-Exportweg	5
1.2.3.1	<i>SRP-dependent Targeting</i>	6
1.2.3.2	<i>SecB-dependent Targeting</i>	6
1.2.3.3	Das <i>E. coli</i> -Translokon	7
1.2.3.4	Die Translokations-Maschinerie	8
1.2.4	Das Chaperon SecB	10
1.2.4.1	Die Struktur von SecB	10
1.2.4.2	SecB-Wechselwirkungen	11
1.3	Das Modellsubstrat <i>Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor</i> (BPTI)	14
1.4	EPR-Spektroskopie	16
1.4.1	Theoretische Grundlagen	16
1.4.2	Die Hyperfeinstruktur	18
1.4.3	Spektren immobilisierter Proben und Abstandsmessungen	19
1.4.4	Das <i>Continuous Wave</i> (CW)-Spektrometer	20
1.4.5	Gepulste EPR	22
1.4.5.1	Rotierendes Koordinatensystem	22
1.4.5.2	<i>Double Electron-Electron Resonance</i> (DEER)	23
2	Problemstellung	28
3	Eigene Ergebnisse und Diskussion	30
3.1	Erzeugung der SecB-Mutanten	30
3.1.1	Primerdesign	30
3.1.2	Amplifizierung der SecB-Gene	32
3.1.3	Charakterisierung und Ligation der SecB-Gene	32
3.1.4	Kontrollverdau und Sequenzierung der SecB-tragenden pET-20b(+) Vektoren	33
3.1.5	Ortsgerichtete Mutagenese	34
3.2	Proteinisolierung von SecB	38
3.2.1	Expression und Lyse	38
3.2.2	Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie	40

3.2.3	Thrombinspaltung	42
3.2.4	Immunologische Charakterisierung	44
3.3	Chemische Modifizierung von SecB	47
3.3.1	<i>Site-directed Spinlabeling</i> mit MTS	47
3.3.2	MALDI-ToF Massenspektrometrie von chemisch modifiziertem SecB	48
3.4	Chemische Modifizierung von BPTI	50
3.4.1	Carboxyamidomethylierung (CAM) des Trypsin Inhibitors BPTI	50
3.4.2	Fluoreszenzlabeling mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	51
3.4.3	MALDI-ToF MS von chemisch modifiziertem BPTI	52
3.5	Komplexbildungsstudien des Chaperons SecB	54
3.5.1	HPLC-Messungen	54
3.5.2	UV/Vis- und Fluoreszenzmessungen der Chaperon-Substrat-Komplexe	56
3.6	Das rekombinante Modellsubstrat BPTI	60
3.6.1	all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	60
3.6.1.1	Charakterisierung und Ligation des all-Ala-BPTI ₁₋₅₈ -Gens	60
3.6.1.2	Expressionsversuche von His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	63
3.6.1.3	Kontrolle der Expression von His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈ mittels EnGFP	64
3.6.2	Optimiertes all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	67
3.6.2.1	Codonoptimierung für all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	67
3.6.2.2	Charakterisierung und Ligation des optimierten Gens	69
3.6.2.3	Proteinexpression des optimierten His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	72
3.6.2.4	Aufreinigung des optimierten His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	74
3.6.3	Nachweis von <i>E. coli</i> optimiertem His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈ mittels ESI-MS/MS	78
3.6.3.1	Charakterisierung der 8 kDa Proteinbande	79
3.6.3.2	Charakterisierung der 13 kDa Proteinbande	81
3.7	Simulation der SecB-Struktur mit Hilfe des <i>Molecular Modeling</i>	84
3.8	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i> (EPR)	87
3.8.1	Simulation von X-Band Tieftemperatur EPR-Spektren zur Abstandsbestimmung	87
3.8.2	W-Band Tieftemperatur EPR-Spektren der SecB-Mutanten	88
3.8.3	DEER-Abstandsmessung von un-/komplexiertem SecB	90
3.8.3.1	DEER-Messungen des Chaperons SecB E90C	91
3.8.3.2	DEER-Messungen des Chaperons SecB C97	94
3.9	Diskussion der Daten	100
4	Zusammenfassung	103

5	Material und Methoden	107
5.1	Material	107
5.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	107
5.1.2	Chemikalien	109
5.1.3	Säulen/Säulenmaterial	111
5.1.4	Kits	111
5.1.5	DNA-Ladder und Proteinmarker	112
5.1.6	Reagenzien, Stammlösungen und Puffer	112
5.1.7	Medien	115
5.1.8	<i>Escherichia coli</i> -Stämme und Plasmide	116
5.1.9	Synthetische Oligonukleotide	116
5.1.10	Enzyme	117
5.1.11	Antikörper	117
5.1.12	Software	118
5.2	Allgemeine Arbeitsmethoden	119
5.2.1	Konzentrationsbestimmungen	119
5.2.1.1	UV/Vis-Spektroskopie	119
5.2.1.2	BCA-Test	119
5.2.1.3	Proteinbestimmung nach Bradford	120
5.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	120
5.2.3	Proteinaufkonzentrierung	121
5.2.3.1	Aufkonzentrierung/Pufferaustausch mit Konzentratoren	121
5.2.3.2	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	121
5.3	Molekularbiologische Methoden	122
5.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	122
5.3.2	Kolonie-PCR	123
5.3.3	Ortsgerichtete Mutagenese	124
5.3.4	Methoden zur DNA-Klonierung	125
5.3.4.1	Abschätzung der Nukleinsäurekonzentration	125
5.3.4.2	Agarosegelelektrophorese	125
5.3.4.3	Aufreinigung der DNA-Fragmente	125
5.3.4.4	Restriktionsverdau	126
5.3.4.5	Dephosphorylierung der DNA-Fragmente	126
5.3.4.6	Ligation	127
5.3.4.7	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	127
5.3.4.8	Minipräparation der Plasmid-DNA	127
5.3.4.9	Maxipräparation der Plasmid-DNA	128
5.3.4.10	DNA-Sequenzierung	128

5.4	Biochemische Methoden	128
5.4.1	Sterilisation von Geräten	128
5.4.2	Herstellung ultra-kompetenter Zellen	128
5.4.3	Glycerinkulturen	129
5.4.4	Expression und Isolierung von SecB	129
5.4.4.1	Aufzucht und Lyse der Zellen	129
5.4.4.2	Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie . . .	130
5.4.4.3	Dialyse von SecB	131
5.4.4.4	Thrombinspaltung von SecB	131
5.4.5	Expression und Isolierung von optimiertem His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈ . . .	132
5.4.5.1	Aufzucht und Lyse der Zellen	132
5.4.5.2	Aufschluss von <i>Inclusion Bodies</i>	132
5.4.5.3	Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie . . .	132
5.4.5.4	Lyophilisieren	133
5.5	Immunologische Methoden	133
5.5.1	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	133
5.6	Chemische Modifizierungen	134
5.6.1	Carboxyamidomethylierung (CAM)	134
5.6.2	Fluoreszenzlabeling mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	134
5.6.3	<i>Site-directed Spinlabeling</i> mit MTS	135
5.7	Massenspektrometrische Methoden	136
5.7.1	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (MALDI)	136
5.7.2	<i>Electrospray Ionization</i> (ESI)	136
5.7.2.1	Tryptischer Verdau	136
5.7.2.2	ESI-MS/MS-Messung	137
5.7.2.3	Datenbanksuche	138
5.8	Chromatographische Methoden	138
5.8.1	<i>High Performance (Pressure) Liquid Chromatography</i> (HPLC)	138
5.9	Spektroskopische Methoden	139
5.9.1	Konfokale <i>Laser Scanning</i> Mikroskopie (LSM)	139
5.9.2	Fluoreszenz-Spektroskopie	139
5.9.3	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i> (EPR)	139
5.9.3.1	<i>Continuous Wave</i> -EPR Messungen (X-Band)	139
5.9.3.2	ESE-detektierte Hochfeld-EPR Messungen (W-Band)	140
5.9.3.3	<i>Double Electron-Electron Resonance</i> (DEER)-Messungen . .	141

Literatur	142
------------------	------------

A Anhang	155
-----------------	------------

A.1	Plasmidkarten	155
A.1.1	Vektor pET-20b(+)	155
A.1.2	Vektor pET-20b(+) SecB ₁₋₁₅₅	156
A.1.3	Vektor pMA all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	156
A.1.4	Vektor pET-20b(+) EnGFP-His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	157
A.1.5	Vektor pET-20b(+) His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈ optimiert	157
A.2	Sequenzierergergebnisse	158
A.2.1	Sequenzierung SecB WT	158
A.2.2	Sequenzierung SecB C97	159
A.2.3	Sequenzierung SecB E90C,C97,102A	160
A.2.4	Sequenzierung SecB Q14C	161
A.2.5	Sequenzierung His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈ optimiert	162
B	Danksagung	163
C	Publikationen	165
D	Lebenslauf	167

Abbildungsverzeichnis

1.1.1	Übersicht der Chaperonfamilien	2
1.1.2	Potentialhyperfläche	3
1.2.1	Signalsequenz	5
1.2.2	Wege der Translokation im bakteriellen System	7
1.2.3	Katalytischer Zyklus der Präprotein-Translokation	9
1.2.4	Räumliche Struktur des SecB-Tetramers	11
1.2.5	SecB-Peptidbindungsstellen und SecA-/Präproteinwechselwirkung mit SecB	13
1.3.1	Kristallstruktur des BPTI und Cysteinverbrückungen nach Kunitz	14
1.4.1	Zeeman-Aufspaltung eines Einelektronensystems	17
1.4.2	Energieniveaus eines Teilchens mit $s = \frac{1}{2}$ und $I = 1$	19
1.4.3	Temperaturabhängige Immobilisierung eines EPR-Spektrums	20
1.4.4	Schematischer Aufbau eines CW-Spektrometers	21
1.4.5	Die erste Ableitung des EPR-Messsignals	21
1.4.6	Pump- und Observerpuls der DEER-Messung	24
1.4.7	DEER: 4-Puls-Experiment	25
1.4.8	Magnetisierungsvektoren des Observerspins A	25
1.4.9	Pake-Pattern	26
3.1.1	SecB <i>forward</i> Primer	31
3.1.2	SecB <i>reverse</i> Primer	31
3.1.3	Amplifizierung der SecB-Gene	32
3.1.4	Kontrollverdau der pET-20b(+) SecB-Vektoren mit NdeI und XhoI	33
3.1.5	Schematische Darstellung zur ortsgerichteten Mutagenese	36
3.1.6	Sequenzvergleich von SecB C97 mit SecB WT	37
3.2.1	Wachstumskurve der <i>large-scale</i> Kultur von His ₆ ^T -SecB ₁₋₁₅₅ C97	39
3.2.2	Induktion und Nickel-Affinitätschromatographie von His ₆ ^T -SecB ₁₋₁₅₅ C97	40
3.2.3	Komplexierung durch Nickel-NTA-Agarose	41
3.2.4	Thrombinspaltung von SecB C97	44
3.2.5	ELISA von His ₆ ^T -SecB ₁₋₁₅₅ und SecB ₁₋₁₅₅	45
3.3.1	<i>Site-directed Spinlabeling</i> von Proteinen mit MTS	48
3.3.2	MALDI-ToF MS von SecB C97 ohne/mit MTS	48
3.4.1	Mechanismus der Carboxyamidomethylierung	51
3.4.2	FITC-Labeling von Proteinen	51
3.4.3	MALDI-ToF MS des chemisch modifizierten BPTI	53
3.5.1	HPLC-Komplexbildungsstudie zwischen SecB E90C und cam-FITC-BPTI	55
3.5.2	Komplexbildungsstudie zwischen SecB E90C und cam-FITC-BPTI	57
3.6.1	2%ige Agarosegele der all-Ala-BPTI ₁₋₅₈ Klonierungsschritte	62

3.6.2	LSM-Aufnahmen der EnGFP-Fluoreszenz	66
3.6.3	Codonoptimierung für all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	68
3.6.4	2%ige Agarosegele des Codon-optimierten all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	70
3.6.5	Sequenzabgleich des Codon-optimierten His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	71
3.6.6	Expressionskontrolle für optimiertes His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	72
3.6.7	Nickel-Affinitätschromatographie, Harnstoff-Denaturierung und Lyophilisierung des optimierten His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	76
3.6.8	ESI-MS/MS Nomenklatur der Peptid-Fragmentierung	79
3.6.9	ESI-MS/MS Spektrum eines Peptid-Fragments des optimierten His ₆ ^T -all-Ala- BPTI ₁₋₅₈	80
3.6.10	ESI-MS/MS Übereinstimmungen mit der Sequenz des optimierten all-Ala- BPTI ₁₋₅₈	81
3.6.11	ESI-MS/MS Spektrum des Peptid-Fragments QHVPVFVTDEMVGHK	82
3.6.12	ESI-MS/MS Spektrum des Peptid-Fragments IQVTGSEGELGIYPGHAPLL- TAIKPGMIR	83
3.7.1	<i>Molecular Modeling</i> von SecB C97 und SecB E90C	84
3.8.1	Simulation der X-Band EPR-Spektren von SecB C97 mit DIPFIT 2.0	88
3.8.2	Hochfeld/Hochfrequenz EPR-Spektren (W-Band) von SecB E90C ohne/mit Substrat	89
3.8.3	Hochfeld/Hochfrequenz EPR-Spektren (W-Band) von SecB C97 ohne/mit Substrat	90
3.8.4	DEER-Messungen von SecB E90C: Zeit- und Frequenzdomäne	91
3.8.5	DEER-Messung von SecB E90C: Abstandsverteilung	92
3.8.6	Vergrößerungsausschnitt der D-Untereinheit des SecB WT	93
3.8.7	DEER-Messung von SecB C97: Hohe dipolare Frequenzen	95
3.8.8	DEER-Messung von SecB C97: Kleine dipolare Frequenzen	96
3.8.9	Schematisches Modell der Substratbindung von SecB	98
A.1.1	Plasmidkarte pET-20b(+)	155
A.1.2	Plasmidkarte pET-20b(+) SecB ₁₋₁₅₅	156
A.1.3	Plasmidkarte pMA all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	156
A.1.4	Plasmidkarte pET-20b(+) EnGFP-His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	157
A.1.5	Plasmidkarte pET-20b(+) His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈ optimiert	157
A.2.1	Sequenzierung SecB WT	158
A.2.2	Sequenzierung SecB C97	159
A.2.3	Sequenzierung SecB E90C,C97,102A	160
A.2.4	Sequenzierung SecB Q14C	161
A.2.5	Sequenzierung His ₆ ^T -all-Ala-BPTI ₁₋₅₈ optimiert	162

Tabellenverzeichnis

3.1.1	Punktmutationen zur Erzeugung der Mutante SecB C97	35
3.6.1	Sequenzveränderungen zur Generierung von all-Ala-BPTI ₁₋₅₈	68
3.7.1	MTS-Abstände im SecB-Tetramer	85
3.7.2	Abstände zwischen den Rückgrat-C _α -Atomen der MTS-tragenden Cysteine .	86
3.8.1	Vergleich der theoretisch berechneten und experimentell bestimmten MTS- Abstände	99
5.1.8	Stammlösungen	113
5.1.9	Medien und Nährlösungen	115
5.1.10	Bakterienstämme	116
5.1.11	Vektoren	116
5.1.14	Antikörper	118
5.1.15	Software	118
5.3.3	PCR-Universalprogramm	123
5.9.1	Parameter der X-Band CW-EPR Messungen	140

Verwendete Abkürzungen

Amp	Ampicillin
Abs ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Å	Ångström
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin-Natriumsalz
bp	Basenpaare
BPTI	<i>Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor</i>
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
cam	carboxyamidomethyliert
cfu	<i>colony-forming units</i>
CW	<i>Continuous Wave</i>
db	Dezibel
DEER	<i>Double Electron-Electron Resonance</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESE	Elektronen Spin Echo
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
EtBr	Ethidiumbromid
ε	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Gauss
GBP	<i>galactose-binding protein</i>

GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GHz	Gigahertz
Gdn-HCl	Guanidin-Hydrochlorid
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HPLC	Hochleistungs-/Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kana	Kanamycin
KAc	Kaliumacetat
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LSM	<i>Laser Scanning</i> Mikroskop
MALDI-ToF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight</i>
mAU	<i>Milliabsorption Units</i>
MBP	<i>maltose-binding protein</i>
MD	molekulardynamisch
mg	Milligramm
Mg(Ac) ₂	Magnesiumacetat
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MTS	1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- Δ^3 -pyrrolidin-3-methylthiosulfonat
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
Omp	<i>outer membrane protein</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Proteindatenbank

Pipes	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
preMBP	<i>precursor maltose-binding protein</i>
r	Radius
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SA	Sinapinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SL	Spinlabel
SRP	<i>signal recognition particle</i>
T	Tesla
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
³ RNA	<i>transfer-Ribonucleic Acid</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vis	sichtbar
WT	Wildtyp

1 Einleitung und Theorie

Im Vergleich zu eukaryotischen Zellen erscheint der Aufbau eines Prokaryoten recht einfach, jedoch lassen sich auch bakterielle Zellen in unterschiedliche Kompartimente gliedern. Im Zellinneren befindet sich das Cytoplasma. Dieses wird von der cytoplasmatischen Membran umschlossen, welche wiederum durch den periplasmatischen Raum von der äußeren Membran abgetrennt wird (Fekkes und Driessen, 1999). Die Proteinbiosynthese der Prokaryoten erfolgt an den Ribosomen im Cytosol. Um ihre speziellen Aufgaben erfüllen zu können, müssen die synthetisierten Proteine erkannt und zu ihrem Bestimmungsort geleitet werden. Dies ist, unter anderem, die Aufgabe der Chaperone.

Das tetramere Chaperon SecB ist an der post-translationalen Proteintranslokation in den periplasmatischen Zellraum vieler Proteobakterien beteiligt (Weiss und Bassford, 1990). Dazu bindet es einerseits an die entsprechenden Substrate und hält die Präproteine somit in einem translokationskompetenten Zustand, in welchem sie nicht falten oder aggregieren können und geleitet sie zum membranständigen Exportkanal. Andererseits erkennt es spezifisch SecA, die ATPase-Untereinheit der Translokase, und aktiviert diese für den Proteinexport.

1.1 Molekulare Helfer: Die Chaperone

Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurde die Rolle der Chaperone („Anstandsdamen“) zunehmend erforscht und aufgeklärt. Es handelt sich bei ihnen um eine Klasse von ubiquitären, evolutionär hochkonservierten Molekülen. Diesen molekularen Lotsen ist ihre besondere Affinität für nicht-native Konformationen, wie hydrophobe Strukturen entfalteter oder teilweise denaturierter Peptidsegmente, gemein. Sie erkennen diese und sind in der Lage, eine Aggregation naszierender, fehlgefalteter oder kürzlich denaturierter Polypeptide und Proteine zu verhindern und deren korrekte Faltung in den nativen Zustand zu ermöglichen (Hartl, 1996; Panse *et al.*, 2001; Zhou und Xu, 2005). Oftmals geschieht dies auch mit der Unterstützung von Co-Chaperonen und unter Energieverbrauch, wie z. B. der Hydrolyse von ATP (Buchner, 2002). Generell interagieren Chaperone mit einer Vielzahl von verschiedenen Polypeptidketten, ohne dabei offensichtliche Präferenzen für bestimmte Sequenzmotive aufzuweisen (Gething und Sambrook, 1992; Hartl, 1996). Nativ gefaltete oder sehr kleine Proteine, die sich eigenständig in ihre native Struktur falten, werden von ihnen nicht gebunden.

Chaperone spielen ebenfalls eine Rolle beim Transport von Proteinen, bei der Regulierung physiologischer Prozesse und können Proteine sogar bei Wärmeeinwirkung stabilisieren. Abb. 1.1.1 gibt tabellarisch einen kurzen Überblick über einige Chaperonfamilien und deren jeweilige

Funktion. Die Namen der Chaperonfamilien leiten sich vom Molekulargewicht der jeweiligen Hauptvertreter ab (Mogk *et al.*, 2001).










Chaperonfamilie	Struktur	ATP	Vertreter prok. euk.	Co-Chaperon	Funktion
Hsp100	6-7-mer 	+	ClpB ClpA Hsp104		- Disaggregation zusammen mit Hsp70 - Proteolyse zusammen mit der Protease ClpP - Thermoresistenz - Disaggregation zusammen mit Hsp70
Hsp90	Dimer 	+	HtpG Hsp90	Hop, p23, CDC37	- Resistenz gegen extremen Hitzeschock - Stressresistenz, Kontrolle der Faltung und Aktivität von Steroidrezeptoren, Proteinkinasen u. a.
Hsp70	Monomer 	+	DnaK	DnaJ, GrpE	- <i>De-novo</i> -Proteinfaltung - Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen - Auflösung von Proteinaggregaten zusammen mit ClpB - Regulation der Hitzeschockantwort
			Hsp70 Hsc70	Hsp40 Bag1 Hip Chip Hop HspBP1	- <i>De-novo</i> -Proteinfaltung - Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen - Auflösung von Proteinaggregaten zusammen mit Hsp104 - Regulation der Hitzeschockantwort - Regulation der Aktivität gefalteter Regulatorproteine (z. B. Transkriptionsfaktoren und Kinasen)
Hsp60	14-mer 	+	GroEL	GroES	- <i>De-novo</i> -Proteinfaltung - Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen
	16-mer 		CCT/TRiC	Prefoldin	- <i>De-novo</i> -Faltung von Actin und Tubulin
sHsp	8-24-mer 		IbpA IbpB		- Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen - Bindung an Inclusion Bodies
			Hsp25 Crystallin		- Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen - Bestandteil der Linse des Wirbeltierauges
Trigger-Faktor	Monomer 		Trigger-Faktor	-	- Ribosomen-assoziiertes Chaperon mit Funktion in der <i>De-novo</i> -Proteinfaltung
NAC	Heterodimer 		NAC		- Ribosomen-assoziiertes Chaperon mit potentieller Funktion in der <i>De-novo</i> -Proteinfaltung
SecB	Tetramer 		SecB		- Sekretion von Proteinen

Abb. 1.1.1: Tabellarische Übersicht der Chaperonfamilien, ihrer Struktur und Funktion (Mogk *et al.*, 2001).

Damit Proteine ihre physiologischen Funktionen erfüllen können, ist die korrekte räumliche Anordnung der Polypeptide von entscheidender Bedeutung. Ihre Faltung in die Sekundär- und Tertiärstruktur wird durch die Primärsequenz bedingt (Anfinsen, 1973) und ist ein hochkooperativer Prozess. Fehlgefaltete (pathologisch gefaltete) Proteine können schlimmstenfalls sogar Verursacher schwerer Krankheitsbilder, wie beispielsweise Prionenerkrankungen (Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Kuru) oder der Alzheimer-Krankheit sein.

Es würde jedoch einige Zeit in Anspruch nehmen, bis ein Protein von selbst in die energetisch vorteilhafteste Konformation gelangte (Stryer, 1996), welche der nativen Struktur entspricht. Dies veranschaulicht das „Levinthal’sche Paradoxon“. Die Anzahl der möglichen Faltungen X steigt exponentiell mit der Anzahl der Aminosäurereste n an. Cyrus Levinthal berechnete, dass sich selbst bei einem vergleichsweise kleinen Protein aus 100 AS, bei dem jeder Rest nur drei verschiedene Konformationen einnehmen könnte, bereits eine Gesamtzahl von $X^n = 3^{100}$, d. h. $5 \cdot 10^{47}$ möglicher Strukturen ergäbe. Angenommen man benötigte nur 10^{-13} s, um von einer Konformation in die nächste zu gelangen, so dauerte dies immer noch $5 \cdot 10^{47} \cdot 10^{-13}$ s, d. h. $1,65 \cdot 10^{27}$ Jahre, bis das Protein in seine energetisch günstigste, native Form gefaltet wäre

(Levinthal, 1968). Zum Vergleich: Das Alter der Erde beträgt „nur“ $4,555 \cdot 10^9$ Jahre! Typische Faltungszeiten für Proteine liegen allerdings im Sekunden- bis Millisekundenbereich.

Ferner kommt noch hinzu, dass das aminoterminal Ende einer frisch translatierten Proteinkette das Ribosom, bzw. das endoplasmatische Reticulum (ER), einige Sekunden oder gar Minuten vor dem carboxyterminalen Ende verlässt. Dem neuen Polypeptid steht somit noch nicht die gesamte Faltungsinformation bereit und es hat aufgrund der hohen Proteinkonzentration der Umgebung (*molecular crowding*: 340 mg/ml, verglichen mit weniger als 1 mg/ml für optimale Rückfaltung *in vitro* (Mogk *et al.*, 2001)) ausreichend Zeit und Partner für schädliche Interaktionen (Stryer, 1996). Exponierte hydrophobe Aminosäuren („klebrige Stellen“) erhöhen dabei die Gefahr der Aggregation. Daher ist die co- und post-translationale Kontrolle der Proteinfaltung, z. B. durch Chaperone, erforderlich.

Chaperone können jedoch nicht nur missgefaltete Proteine binden und deren Aggregation verhindern (*holder*). ATP-abhängig sind sie ebenfalls in der Lage, Konformationsänderungen zu induzieren, um Proteine in ihre aktive Form zurückzufalten (*folder*). Dieser Aspekt führt zum zunehmenden Einsatz von Chaperonen in der biotechnologischen Herstellung medizinischer Wirkstoffe, die oftmals in Fremdorganismen hergestellt werden und sich dort als Aggregate in *inclusion bodies* anreichern. Betrachtet man die potentielle Energie der möglichen Proteinkonformationen nach dem molekularmechanischen Modell der „Energielandschaften“ als eine Art Potentialhyperfläche bzw. „Faltungstrichter“ (Mogk *et al.*, 2001), bei dem die horizontalen Koordinaten den Bewegungsfreiheitsgraden entsprechen, entdeckt man in vertikaler Richtung mehrere Energieminima (vgl. Abb. 1.1.2). Fehlgefaltete Polypeptide befinden sich in einem der Nebenminima, aus dem sie sich bei Raumtemperatur allein durch die Brown'sche Molekularbewegung nicht mehr befreien können (Leinisch, 2005). Chaperone stellen die zur Umfaltung nötige Aktivierungsenergie bereit, damit das Protein in den thermodynamisch günstigsten Zustand, welcher der nativen Struktur entspricht, gelangen kann (Mogk *et al.*, 2001).

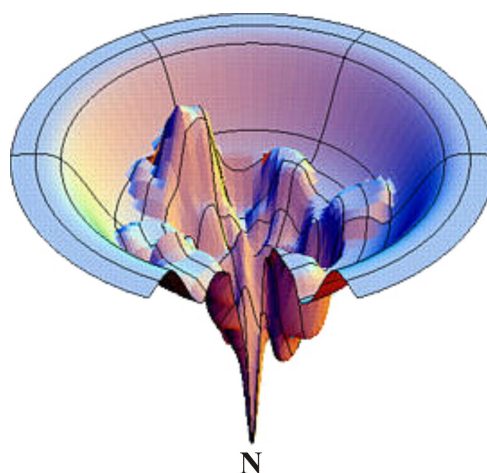


Abb. 1.1.2: Potentialhyperfläche in zwei Bewegungsfreiheitsgraden. Dargestellt sind diverse Nebenminima sowie das absolute Minimum „N“ (Krishnan, 2004).

Gebunden an Chaperone weisen Proteine keinerlei biologische Aktivität auf. So sind Chaperone ebenfalls in der Lage, Vorgänge zu inhibieren oder induzieren.

Äußere Stressbedingungen, wie ein plötzlicher Temperaturanstieg, können zur Aggregation oder gar zum proteolytischen Abbau vieler Proteine führen (Mogk *et al.*, 2001). Die Zelle reagiert darauf zum eigenen Schutz mit der verstärkten Ausschüttung von Chaperonen, beispielsweise von Hitzeschockproteinen (Hsp). Andere Faktoren, wie die Schädigung durch freie Radikale, haben ähnliche Effekte (Stryer, 1996).

Des Weiteren tragen Chaperone im sekretorischen Transportweg entscheidend zur Translokation bei, da sie das entsprechende, zu sezernierende (*precursor*-)Protein in einem translokationskompetenten, nur teilweise gefalteten Zustand halten, welcher einen Transport durch den Exportkanal gestattet. Die nativ gefaltete Struktur wäre zu kompakt für einen Durchtritt durch die Membran. SecB ist eines der sekretorischen Chaperone in *E. coli* und im Folgenden soll sein Exportmechanismus in Kontext gesetzt sowie seine Struktur genauer vorgestellt werden.

1.2 Transport integraler und sekretorischer Proteine

Zum Export integraler und sekretorischer Proteine treten in Bakterien zwei Haupttransportsysteme auf: Das Tat-System (*twin-arginine translocation*) und das Sec-System (*secretory*). Die entsprechenden Transporter beider Transportwege werden von den zu sezernierenden Proteinen durch spezielle Signalsequenzen angesteuert.

1.2.1 Signalsequenzen

Um vom Cytosol ausgehend zu ihrem jeweiligen Translokationsort zu gelangen, weisen Präproteine meist kurze, spezielle aminoterminaler Verlängerungen auf, die Signalsequenzen, welche von Chaperonen erkannt werden. Untereinander sind diese Signalpeptide nicht sequenzhomolog, weisen jedoch allesamt gemeinsame Merkmale in Form von drei Domänen auf (Blobel und Dobberstein, 1975).

Die aminoterminaler N-Domäne ist eine Region mit positiver Netto-Ladung, die zwar nicht essentiell für die Translokation ist, jedoch deren Umsetzungsrate steigert (de Vrije *et al.*, 1990). Die hydrophobe Kern-Region (H-Domäne) ist der wichtigste Teil der Signalsequenz, variabel in ihrer Länge und bildet eine α -helikale Konformation aus (Kim und Kendall, 2000). Hydrophobie und Länge dieser Domäne bestimmen im Allgemeinen die Effizienz der Translokation. Auf der polaren C-Domäne (*cleavage site*) befindet sich zwischen Signalsequenz und reifer Proteindomäne die Schnittstelle für die Signalpeptidase. In Abb. 1.2.1 sind diese Domänen schematisch am Beispiel einer 18 - 26 AS langen Signalsequenz des Sec-abhängigen Exportwegs demonstriert.

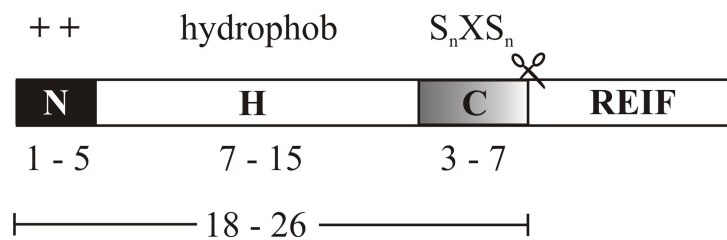


Abb. 1.2.1: Domänen der Signalsequenz eines Sec-abhängigen Präproteins: N-Domäne mit positiver Nettoladung, hydrophobe H-Domäne und *cleavage site*-tragende C-Domäne (Fekkes und Driessen, 1999).

Signalsequenzen bewirken einen verlangsamten Faltungsprozess des naszierenden Proteins und ermöglichen Chaperonen so, an sie zu binden. Darüber hinaus markieren sie die Proteine für den jeweiligen Translokationsweg. Im Fall des *SecB-dependent Targeting* (vgl. Abschnitt 1.2.3.2) ist die Bindung der Signalsequenz an SecA sogar der Auslöser des Translokationsschritts (Fekkes *et al.*, 1998).

1.2.2 Der Tat-Exportweg

Das Tat-System basiert auf der Erkennung von Signalsequenzen und verdankt seinen Namen einem konservierten Doppelarginin (RR)-Motiv in der N-Domäne der Signalsequenz. Es reguliert den post-translationalen Transport und Export bereits vollständig gefalteter Substrate (Panahandeh *et al.*, 2009) und ist nur von thermodynamischen Parametern abhängig (Randall und Hardy, 2002). Das Translokon ist aus drei integralen Membranproteinen TatA, TatB und TatC zusammengesetzt. Hierbei bilden TatB und TatC den Rezeptor-Komplex und nach erfolgter Substratbindung bindet TatA ebenfalls an den Komplex, so dass der Protein-Export erfolgen kann (Fürst und Müller, 2010). Lösliche Faktoren werden bei diesem Translokationsweg nicht benötigt. Im rechten Teil von Abb. 1.2.2 ist dieser Exportweg verdeutlicht.

1.2.3 Der Sec-Exportweg

Nach Fekkes (Fekkes und Driessen, 1999) gibt es in der prokaryotischen Zelle zur Translokation ungefalteter Proteine im Zweig des sekretorischen Exportwegs zwei co-existente Mechanismen: *signal recognition particle*- (SRP) und SecB-abhängiges *Targeting*. Beide Wege beruhen auf der initialen „Zielsteuerung“ durch die löslichen Faktoren SRP und SecB, verwenden das SecYEG-Translokon (vgl. Abschnitt 1.2.3.3) und sind GTP- bzw. ATP-abhängig.

1.2.3.1 SRP-dependent Targeting

Das prokaryotische *E. coli* SRP (Ffh) ist in der Lage, co-translational hydrophobe Signalsequenzen von ribosomenassoziierten Polypeptidketten naszierender Plasmamembranproteine, die zwischen 70 und 150 AS lang sind (Fekkes und Driessen, 1999), zu binden, während der Rest der Peptidkette immer noch an das Ribosom gebunden ist. Als Folge dessen wird die weitere Peptid-Elongation kurzzeitig unterbrochen und der ribosomal gebundene Komplex assoziiert mit dem *E. coli* SRP-Rezeptor FtsY, der sowohl cytosolisch, als auch membrangebunden vorliegt (Luirink und Dobberstein, 1994). Dieser Komplex tritt anschließend über die große ribosomale Untereinheit in Wechselwirkung mit dem SecYEG-Translokon des Translokase-Komplexes (vgl. Abschnitt 1.2.3.3). Dort wird das von den GTPasen SRP und FtsY gebundene GTP unter Freisetzung des gebundenen Substrats ins Translokon hydrolysiert. SRP und FtsY lösen sich vom Komplex und die ribosomale Translation wird fortgesetzt, so dass der wachsende Proteinfaden über den SecYEG-Transportkanal mit Hilfe der ATPase SecA in die Membran integriert wird (Chen und Tai, 1987; Fürst und Müller, 2010) (vgl. Abb. 1.2.2, linke Zyklushälfte). Die „Zielsteuerung“ via SPR kommt u. U. ebenfalls für sekretorische Proteine mit ausgeprägten hydrophoben Signalsequenzen in Betracht.

1.2.3.2 SecB-dependent Targeting

In vivo bindet das cytosolische Chaperon SecB zumeist post-translational an die reife Protein-domäne sekretorischer Präproteine (Randall *et al.*, 1997). Dabei besitzt SecB, im Vergleich zur SRP-abhängigen Erkennung, keine Spezifität gegenüber Signalsequenzen, d. h. es gehen keine positiven Beiträge zur Bindungsenergie oder Bindungsaffinität von diesen aus (Kim und Kendall, 2000) und die Substratbindung erfolgt davon unabhängig. So lagert sich SecB an die reife Proteinregion eines zu exportierenden Präproteins an, hält es in einem translokationskompetenten Zustand für den späteren Export und geleitet es zur membrangebundenen Motor-ATPase SecA (vgl. Abb. 1.2.2, rechte Zyklushälfte). Dort angekommen werden SecB und die Signalsequenz des Präproteins von SecA erkannt und das Präprotein an SecA übergeben (Fekkes *et al.*, 1998). Enzymologisch gesehen ist das Signalpeptid der allosterische Aktivator des SecYEG-Translokons (Gouridis *et al.*, 2009; Fürst und Müller, 2010), da SecA nun die Translokation durch Hydrolyse von ATP initialisiert. SecB wird aus dem ternären Komplex (Stöchiometrie SecB:SecA:Substrat 4:2:1 (Driessen, 2001)) freigesetzt und steht somit für einen erneuten Transportzyklus zur Verfügung. Eine detailliertere Beschreibung der Translokation durch den SecYEG-Kanal ist im nachfolgenden Abschnitt gegeben. Auf der periplasmatischen Seite tritt das translozierte Protein mit periplasmatischen Faktoren (z. B. Ppi und Skp) in Kontakt, die es zu seinem Bestimmungsort weitergeleiten (Antonoaea *et al.*, 2008; Kadokura und Beckwith, 2009).

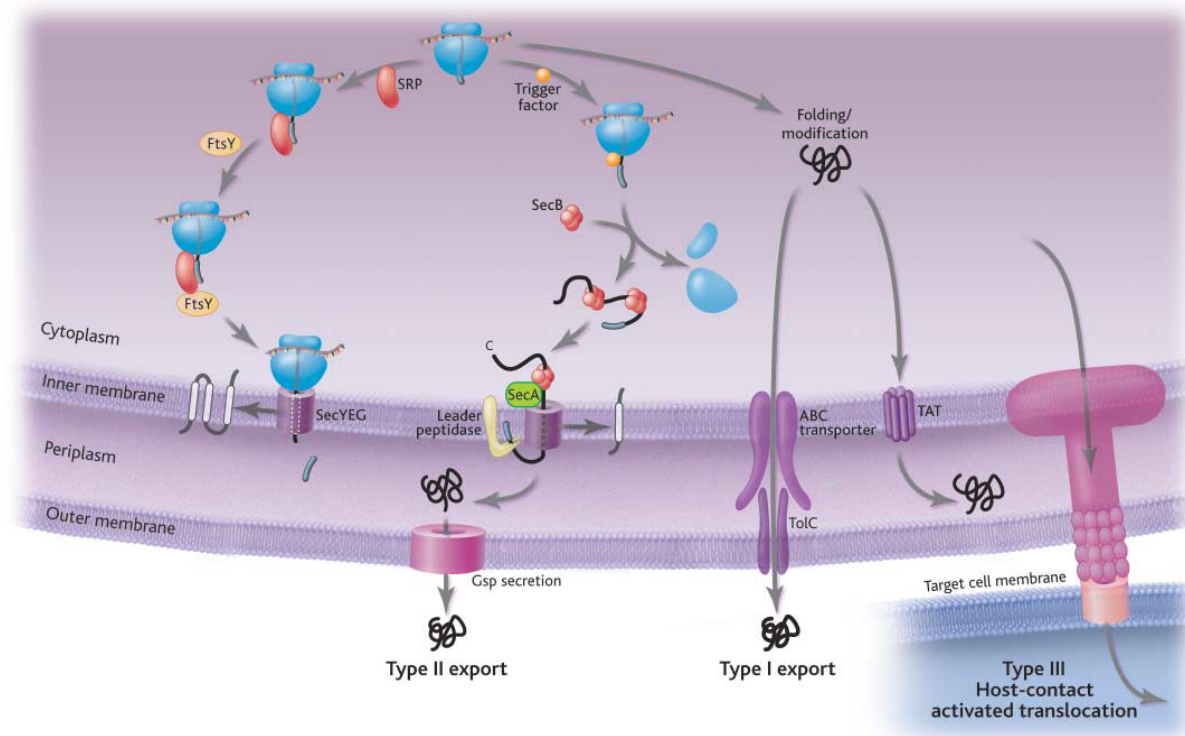


Abb. 1.2.2: Verschiedene Möglichkeiten der Translokation im bakteriellen System (Wickner und Schekman, 2005; Luirink und Sinning, 2004). Die linke Hälfte des Zyklus zeigt das *SRP-dependent* und die rechte das *SecB-dependent Targeting*. Im rechten Teil der Abbildung sind ergänzend der Tat-Export sowie die hier nicht weiter behandelten ABC- und Kontakt-aktivierten Exportwege aufgezeigt.

1.2.3.3 DAS *E. coli*-TRANSLOKON

Als Translokon oder auch Translokase-Komplex wird der trimere Enzymkomplex aus den integralen Membranproteinen SecY, SecE und SecG sowie der peripher gebundenen ATPase SecA bezeichnet (Douville *et al.*, 1995; Driessen *et al.*, 1998). Das oligomere Sec-Translokon ist evolutionär konserviert, wobei Sec61p sein eukaryotisches Analogon im ER darstellt (Sijbrandi *et al.*, 2003). Die 102 kDa schwere dimere ATPase SecA ist einzigartig in Bakterien (Fürst und Müller, 2010) und spielt die Schlüsselrolle bei der Translokation der Präproteine durch die cytoplasmatische Membran (Cunningham *et al.*, 1989). Sie bindet ATP zwischen zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD). Nach Zimmer *et al.* tritt SecA über die Spitze eines Zweihelix-Fingers, welcher cytoplasmatisch in den SecYEG-Kanal hineinragt, und über eine klammerförmige Bindetasche (*cross-linking* Domäne PPXD) mit dem entfalteten Substrat in Kontakt (Zimmer *et al.*, 2008; Fürst und Müller, 2010). Durch wiederholte Zyklen von ATP-Bindung und -Hydrolyse wird die zur Translokation notwendige Energie bereitgestellt (Schiebel *et al.*, 1991). Dabei kommt es in SecA zu Konformationsänderungen, die durch alternierendes Lösen und Umfassen des Präproteins durch die beiden Präprotein-Kontaktstellen sukzessiv zur Translokation in den Exportkanal führen (Fürst und Müller, 2010) (vgl. Abschnitt 1.2.3.4).

Am flexiblen C-terminalen Sequenzende von SecA befindet sich eine durch Zink stabilisierte 22 Aminosäuren lange Domäne, welche die primäre Bindungsstelle von SecB bei der Präproteïnübertragung darstellt (Fekkes *et al.*, 1997).

Seitlich betrachtet ähnelt der passive SecYEG-Kanal einem Doppeltrichter. Die spitzen Enden beider Konen sind einander zugewandt und liegen im Zentrum der Membranlipiddoppelschicht. Sie bilden eine Verengung mit einem Durchmesser von ca. 5 Å - 8 Å (van den Berg *et al.*, 2004; Fürst und Müller, 2010). Die Öffnungen der Trichter weisen zum Cytoplasma bzw. Periplasma hin. Die Hauptkomponente der Translokationspore stellt das 49 kDa schwere SecY dar, welches durch zehn transmembrane Helices (zwei Hälften à fünf Helices) den Kanal zur Ausschleusung des Proteins durch die Membran auskleidet. Die Frontseite beider Hälften gestattet die seitliche Öffnung des Kanals zu den Membranlipiden, so dass auf diese Weise der Einbau von Membranproteinen möglich ist. Die Rückseite des SecYEG-Kanals ist kovalent verbunden und wird von dem 14 kDa großen SecE zusammengehalten (Fürst und Müller, 2010), welches selber wiederum aus drei Transmembrandomänen besteht (Schatz *et al.*, 1989). Außerdem tritt SecY mit SecA in Wechselwirkung und ermöglicht SecA dadurch, als Komplex mit dem Präprotein und ATP in die Plasmamembran einzudringen (Duong und Wickner, 1997). SecG (12 kDa) bildet die topologische Flanke von SecY und ist im Gegensatz dazu nicht essentiell (Duong und Wickner, 1997), übt jedoch eine unterstützende Wirkung auf die Translokation aus. Im substratfreien Zustand ist der SecY-Kanal durch ein kurzes α -helikales Strukturelement wie durch einen Stopfen verschlossen. Bei Substratbindung verlagert sich dieser nach außen, und der Kanal öffnet sich.

Drei weitere integrale Membranproteine, SecD, SecF und SecYajC, sind mit dem SecYEG-Kern assoziiert. Ihre Aufgabe ist größtenteils noch ungeklärt, jedoch sind sie für die eigentliche Proteintranslokation nicht entscheidend.

1.2.3.4 DIE TRANSLOKATIONS-MASCHINERIE

Die Aufgaben des Transportsystems (*translocation machinery*) liegen 1.) in der Erkennung der Signalsequenzen des jeweils zu exportierenden Proteins, 2.) in der Öffnung des Kanals für dieses spezielle Protein, ohne dabei für andere Moleküle permeabel zu sein, 3.) im Transport durch die Membran und 4.) im Schließen des Kanals (Matlack *et al.*, 1998).

Der Mechanismus der Translokation kann, wie in Abb. 1.2.3 am Beispiel der SecB-abhängigen „Zielsteuerung“ dargestellt, erklärt werden (Wickner und Leonard, 1996) (vgl. auch 1.2.3.2):

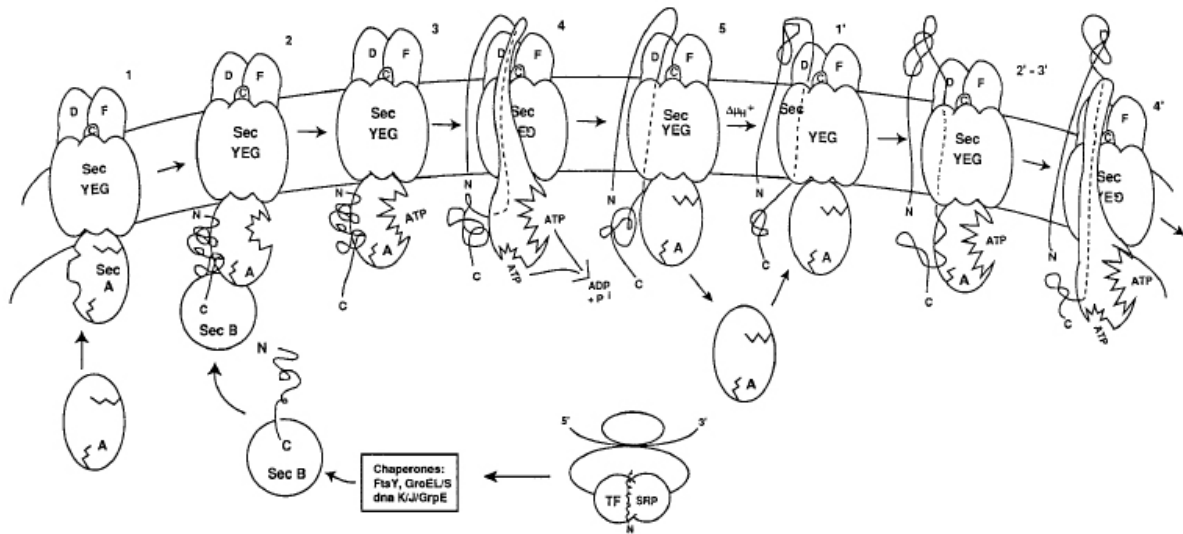


Abb. 1.2.3: Der katalytische Zyklus der Präprotein-Translokation (Wickner und Leonard, 1996).

Nach Anlagerung cytosolischem SecA an den SecYEG-SecDFyajC-Rezeptor (1) wird dieses in zweierlei Hinsicht aktiviert. Auf der einen Seite für die Erkennung der Signalsequenz des reifen Präproteins sowie SecB ($K_d \sim 10$ nM (Fekkes *et al.*, 1997; Hartl *et al.*, 1990)) und auf der anderen Seite als Enzym für die Bindung und Hydrolyse von ATP (2). Dimeres SecA wechselwirkt über seine C-terminalen, Zink-tragenden Teilstücke symmetrisch mit dem „von unten“ anlagerndem SecB (Fekkes und Driessen, 1999). Diese Wechselwirkung mit SecB führt zu einer konformellen Änderung in SecA und zu einer Erhöhung der SecA ATPase-Aktivität (Kim und Kendall, 2000). SecA transferiert so das Präprotein von SecB an seine *cross-linking* Domäne PPXD, welche sich in dieser Anordnung in unmittelbarer Nähe befindet (Zhou und Xu, 2005). Die Bindung von ATP an die NBD1-Region bewirkt schließlich die Abspaltung von SecB vor Beginn der eigentlichen Translokation (3) und die Insertion eines 30 kDa großen SecA-Teilstücks in und teilweise sogar durch die Membran (4) (vgl. Abschnitt 1.2.3.3). Unter ATP-Hydrolyse erfolgt so die gleichzeitige Einlagerung einer etwa 25 AS großen Schleife des Präproteins in den Kanal, was eine Abspaltung des Prä-Schwanzes durch die periplasmatische Signalpeptidase ermöglicht. Einhergehend mit der SecA-Insertion erfolgen eine Inversion der Topologie der SecG-Untereinheit (symbolisiert durch das invertierte G) und die Stabilisierung von SecA durch die Untereinheiten SecD und SecF. Damit sich SecA wieder aus der Membran zurückziehen kann, ist der Verbrauch eines weiteren ATP notwendig. SecA entlässt das gebundene Präprotein und die Präproteinschleife verweilt in der Membran (5). Nicht-insertiertes SecA kann derweil frei mit cytosolischem SecA austauschen. Im Fall eines günstigen Protonengradienten $\Delta\mu_{H^+}$ kann nun eine schnelle Translokation des Peptids erfolgen. Ist dies nicht der Fall, wiederholt sich der katalytische Translokase-Zyklus (1' - 4') und ein weiteres Stück Präprotein wird, vergleichbar mit der Nadelbewegung einer Nähmaschine, durch die Membran geschoben.

1.2.4 Das Chaperon SecB

Das in *E. coli* und anderen Gram-negativ Zellen vorkommende cytosolische Protein SecB ist essentiell für das bakterielle Wachstum auf nährstoffreichen Medien (Kumamoto und Beckwith, 1985). *In vivo* bindet es zumeist post-translational, aber in seltenen Fällen auch bereits während der ribosomalen Peptidelongation an die reife Proteindomäne sekretorischer Präproteine, wenn diese bereits eine Länge von mindestens 150 AS aufweist (Randall *et al.*, 1997) und hält die Präproteine aggregationsgeschützt in einem translokationskompetenten Zustand (Collier, 1993). *Maltose-binding protein* (MBP), *galactose-binding protein* (GBP), *outer membrane protein* (OmpA und OmpF) und LamB gehören hierbei zu seinen natürlichen Substraten (Kumamoto, 1990; Topping und Randall, 1994; Khisty *et al.*, 1995). *E. coli*-Zellen mit einer SecB^{Null}-Mutation zeigen eine verminderte Exportaktivität für diese Proteine (Hartl *et al.*, 1990). *In vitro* bindet SecB schnell an kleine, nicht-sekretorische Proteine, die allerdings ebenfalls in einer nicht-nativ gefalteten Konformation vorliegen müssen. Beispiele für solche Modellsubstrate sind die Ribonuklease A oder der *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI) (Fekkes *et al.*, 1995; Diamond *et al.*, 1995; Panse *et al.*, 1998; Randall und Hardy, 2002), welcher in Abschnitt 1.3 genauer vorgestellt wird.

1.2.4.1 DIE STRUKTUR VON SECB

In physiologischer Umgebung liegt das saure SecB als Tetramer mit einer molekularen Masse von 68,8 kDa vor. Röntgenstrukturanalysen von SecB aus *E. coli* und *H. influenzae* (Xu *et al.*, 2000; Dekker *et al.*, 2003) belegen in Übereinstimmung mit Studien von Murén und Topping (Murén *et al.*, 1999; Topping *et al.*, 2001), dass das Protein als ein Dimer identischer Dimere aufgebaut ist.

Jede der 17,2 kDa (155 AS) schweren monomeren Untereinheiten (Smith *et al.*, 1996) besteht aus einer viersträngigen, antiparallelen β -Faltblatt Anordnung (AS 15 - 96) und einem Paar antiparalleler α -Helices. Das Dimer an sich ist ein flaches Molekül, welches aus um 180° gegeneinander gedrehten Monomeren besteht, die über das Faltblatt β_1 und die Helix α_1 miteinander verknüpft sind. So kommen die oberflächenexponierten, antiparallelen β -Faltblätter auf derselben Seite des SecB-Dimers zu liegen (vgl. Abb. 1.2.4). Die Stabilisierung des Dimers erfolgt hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen, welche zwischen den beiden antiparallelen β_1 -Ketten beider Monomere ausgebildet werden. Die Assoziation zweier SecB-Dimere zum Tetramer wird durch Einschluss der vier langen α_1 -Helices zwischen den achtsträngigen, nach außen gerichteten antiparallelen β -Faltblättern verwirklicht. Das Tetramer ist sehr stabil, mit einer geschätzten Tetramer-Dimer Gleichgewichtskonstanten von $K_d < 20$ nM bei einem pH-Wert von 7,6 (Murén *et al.*, 1999). Die Dimer-Dimer Schnittstelle wird durch polare Wechselwirkungen, zu denen ebenfalls die Seitenketten der vier α_1 -Helices beitragen, stabilisiert.

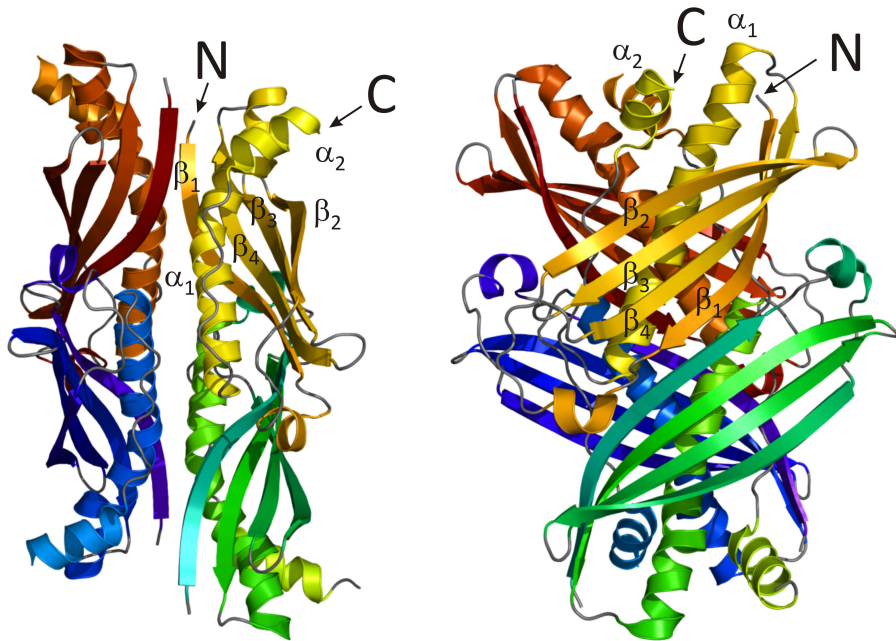


Abb. 1.2.4: Bändermodell des SecB-Tetramers aus zwei zueinander orthogonalen Blickwinkeln. Jede der Untereinheiten ist farblich unterschiedlich gekennzeichnet, wobei Spiralen die α -Helices und Pfeile die β -Faltblätter repräsentieren. In Anlehnung an (Zhou und Xu, 2005) unter Verwendung der Kristallstruktur von *E. coli* SecB-Wildtyp (PDB Code: 1QYN, RCSB PDB) (Dekker *et al.*, 2003).

Die äußeren C-terminalen α_2 -Helices jeder der Untereinheiten zeigen eine unterschiedliche Anzahl von Windungen und sind nach der dritten Windung nicht mehr am Tetramer angehängt (Randall und Hardy, 2002). NMR-spektroskopische Untersuchungen belegen, dass 13 C-terminale Reste der SecB-Untereinheiten Regionen hoher Mobilität darstellen (Volkert *et al.*, 1999). Natives SecB weist in jeder monomeren Untereinheit vier Cysteine an den Positionen 76, 97, 102 und 113 auf, die durch geeignete Modifizierungen zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen SecB und Substraten genutzt werden können.

1.2.4.2 SEC B-WECHSELWIRKUNGEN

Die Translokation der Proteine kann im SecB-abhängigen Sekretionsweg nur stattfinden, wenn zwei Voraussetzungen erfüllt sind: 1.) SecB bindet an naszierende Polypeptidketten, die weder gefaltet, noch aggregiert sind (Randall und Hardy, 1986) und verlangsamt so deren weitere Faltung (Bassford *et al.*, 1991). 2.) SecB muss die ATPase SecA erkennen und das gebundene Präprotein zur Translokation auf sie übertragen.

Um Präproteine in einem translokationskompetenten Zustand zu halten (Collier, 1993) bindet SecB mit hoher Affinität (K_d 5 - 50 nM) an nicht-native, reife Proteinregionen der Substratmoleküle, wie z. B. MBP, GBP und OmpA (Topping und Randall, 1994), ohne dabei eine Spezifität für bestimmte (Signal-) Sequenzen aufzuweisen. Somit kann SecB nicht zwischen sekretorischen

und nicht-sekretorischen Proteinen unterscheiden (Kim und Kendall, 2000). Die Selektivität der Substratbindung wird auf eine kinetische Partitionierung (*kinetic partitioning*) der Polypeptide zwischen eigener Faltung und Assoziation mit SecB zurückgeführt (Hardy und Randall, 1991). Da nach diesem Modell die SecB-Bindung konkurrierend mit der Substratfaltung erfolgt, werden langsamer faltende Präproteine eher von SecB gebunden (Krishnan *et al.*, 2004). Die Bindung an SecB ist dabei reversibel und verläuft ohne exogenen Energieverbrauch und es kommt zu wiederholten Bindungszyklen des Substrats, welches so ständig der kinetischen Partitionierung ausgesetzt ist (Topping und Randall, 1997). Dieses Modell impliziert, dass Substrate SecB-abhängig sind, nicht weil SecB sie bevorzugt bindet, sondern weil sie nicht von anderen Chaperonen oder SRP erkannt werden (Kim und Kendall, 2000). Doch gerade dieser Umstand verleiht SecB das einzigartige Potential, regulierend bei zellulären Disbalancen zu wirken und ist ein Beleg für die Synergie der Chaperone (Müller, 1996).

Ausgehend von SecB-Kristallstrukturen aus *H. influenzae* und *E. coli* (Xu *et al.*, 2000; Dekker *et al.*, 2003) kann allerdings auf das Vorhandensein einer lokalisierbaren Peptidbindungsregion seitens SecB geschlossen werden. Diese Bindungsregion setzt sich auf jedem Monomer aus zwei Untereinheiten zusammen. Die strukturell flexible Bindungsuntereinheit 1 bildet den tiefen Teil eines Bindungskanals und besteht vornehmlich aus konservierten, hydrophoben und aromatischen Resten (Zhou und Xu, 2005). Bindungsuntereinheit 2 ist dagegen flacher und offener. Sie bildet den Rand des Kanals und besteht aus nicht-aromatischen, hydrophoben Resten, mit Ausnahme des Thr53, welche mit ebenfalls hydrophoben Strukturen ungefalteter Präproteine wechselwirken können (vgl. Abb. 1.2.5(A)). Durch die hohe Symmetrie des SecB werden so vier identische Bindungsstellen geschaffen (Zhou und Xu, 2005), die zusammengenommen eine quer über das SecB-Tetramer verlaufende Bindungsfurche bilden. Obwohl die Substrataffinität zu einer einzelnen Bindungsstelle recht gering ausfällt, gewährleistet eine gleichzeitige Besetzung mehrerer Bindungsstellen eine scheinbar höhere Affinität der Bindung zwischen SecB und Präprotein, ähnlich der Aviditätserhöhung bei multivalenten Antikörpern. Dies lässt Raum zur Spekulation, dass sich lange, unstrukturierte Polypeptidsegmente um das Chaperon herum- oder herüberwickeln könnten, um die Bindungsstellen beider Seiten zu besetzen. Somit entstünde ebenfalls ein enger Kontakt mit dem flexiblen C-Terminus des SecB, was den Schutz dieser proteaseanfälligen Region durch Substratbindung erklären würde (Randall, 1992). Eine Deletion des C-Terminus resultiert zwar in einem stabilen SecB-Protein, verringert jedoch nachweislich die Bereitschaft zur Bindung nicht-nativer Substrate (Diamond und Randall, 1997). Daher ist es wahrscheinlich, dass der C-Terminus auch zur Bindung der Präproteine beiträgt. *In vivo* kommt es durch einen Überschuss an C-terminal verkürztem SecB ebenfalls zu einer starken Beeinträchtigung des Proteinexports.

An der cytoplasmatischen Membranoberfläche hat SecB eine direkte Bindungsaffinität zu SecA, welche durch die Gegenwart von Signalsequenz-tragenden Präproteinen noch gefördert wird (Hartl *et al.*, 1990; Kim und Kendall, 2000). Dabei wechselwirkt eine dimere SecB-Untereinheit,

z. T. elektrostatisch, über die cytosolzugewandten Oberflächen der β -Faltblätter mit jeweils einem der äußeren elektropositiven (Arginin- und Lysin-reichen), Zink-stabilisierten C-Termini der dimeren SecA ATPase (Fekkes und Driessen, 1999; Zhou und Xu, 2003; Kim und Kendall, 2000). Im Detail zeigen Mutagenesestudien, dass Teile der SecA- und auch der preMBP-Bindungsstelle von SecB sich gegenüberliegend ausgerichtet in einer β -Faltblattanordnung befinden (Fekkes und Driessen, 1999) (Abb. 1.2.5(B)) und in alternierender Weise überlappen. Hierbei tragen die hauptsächlich hydrophoben Reste Phe74, Cys76, Val78 und Gln80 zur Präprotein- und die alternierenden Reste Leu75, Glu77 und Gln79 zusammen mit den in SecB invarianten Resten Asp27 und Glu31 (Kimsey *et al.*, 1995) zur SecA-Bindung bei. Letztere bilden eine negativ geladene Oberfläche aus, welche mit der positiv geladenen SecB-Bindungsregion von SecA wechselwirken können. Mutationen in diesem Bereich resultieren in einer gescheiterten SecB-Zielsteuerung an membrangebundenes SecA und Mutationen des hydrophoben Bereichs, der bei allen bekannten SecB-Proteinen konserviert ist, verhindern die Ausbildung stabiler Komplexe zwischen SecB und preMBP (Fekkes und Driessen, 1999).

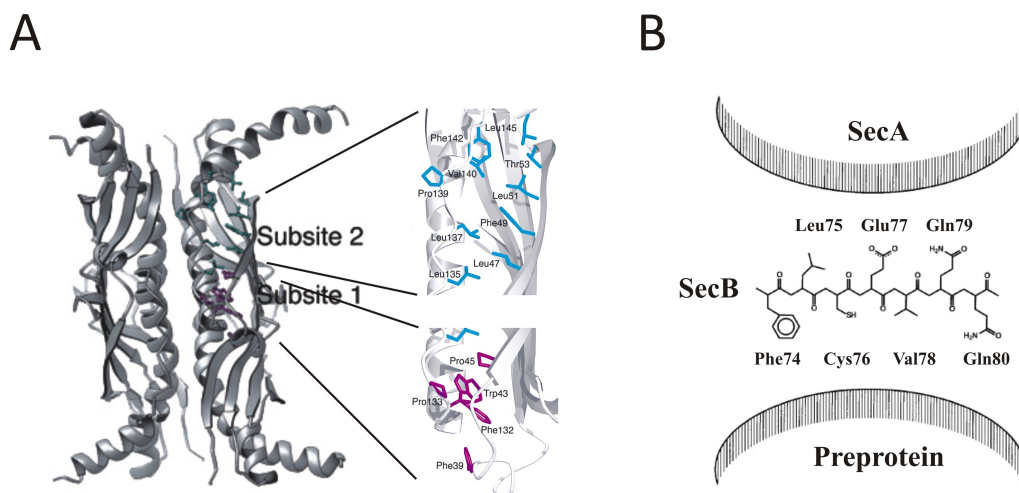


Abb. 1.2.5: (A) Das Bändermodell des SecB Moleküls zeigt die AS innerhalb eines Monomers, welche die Bindungsstelle auskleiden. Die Bindungsuntereinheit 1 ist in magenta, die Bindungsuntereinheit 2 in cyan dargestellt (Xu *et al.*, 2000; Zhou und Xu, 2005). (B) Die SecA- und Präproteinbindungsstellen an SecB zeigen in entgegengesetzte Richtungen einer β -Faltblattanordnung (Fekkes und Driessen, 1999).

1.3 Das Modells substrat *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI)

Der *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI) ist ein stark basisches, monomeres globuläres Protein. Es weist eine geringe molekulare Masse von 6,5 kDa auf und besteht aus 58 Aminosäuren (Mannucci, 1998; Mahdy und Webster, 2004). Diese bilden C- bzw. N-terminal jeweils ein α -helikales Strukturelement und in der Sequenzmitte zwei antiparallele β -Faltblätter, welche über einen Hairpin-Loop miteinander verbunden sind (Ascenzi *et al.*, 2003). Die Kristallstruktur ist im linken Teil von Abb. 1.3.1 dargestellt. In Lösung liegt BPTI mizellenartig als Dekamer bzw. als ein doppeltes Pentamer vor (Hamiaux *et al.*, 2000). Die monomere Aminosäuresequenz enthält sechs konservierte Cysteine, die die kompakte Tertiärstruktur des Proteins durch Ausbildung dreier Disulfidbrücken zwischen den Aminosäurepositionen 5 und 55, 14 und 38 sowie 30 und 51 stabilisieren. Die resultierende Topologie ähnelt einem Faden, der zweimal um sich selbst gefaltet ist (Dittrich und Kanchanawarin, 2011). Eine weitere Stabilisierung erfährt BPTI, sowie viele weitere globuläre Proteine, durch einen kleinen hydrophoben Kern aus nicht polaren Aminosäureseitenketten. Strukturell ist BPTI durch die 1-6, 2-4, 3-5 Verbrückung der sechs Cysteine (vgl. Abb. 1.3.1, rechts) in die Familie der Serinprotease-Inhibitoren des Kunitz-Typs einzuordnen (Kunitz und Northrop, 1936; Ascenzi *et al.*, 2003). Proteine des Kunitz-Typs weisen dadurch allesamt eine strukturelle Ähnlichkeit zu BPTI auf, obwohl signifikante Abweichungen sowohl in der Aminosäuresequenz, als auch in ihrer jeweiligen physiologischen Funktion auftreten.

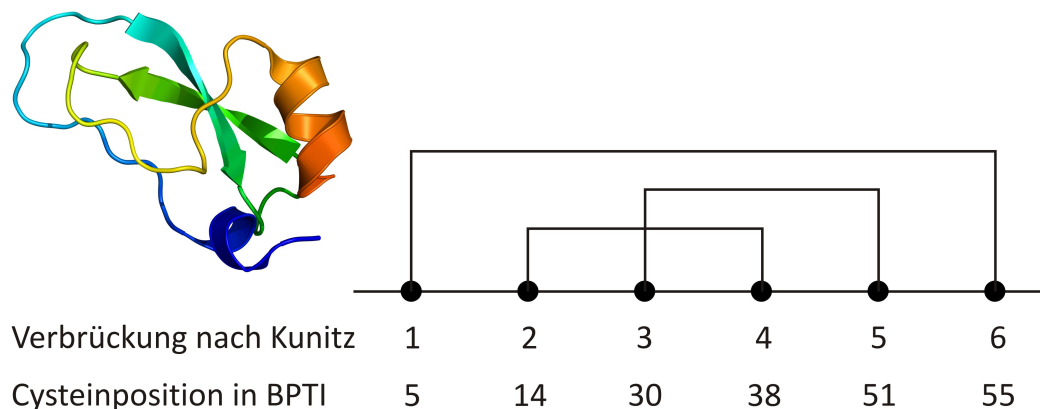


Abb. 1.3.1: Links: Kristallstruktur des monomeren BPTI (PDB Code: 1BPI, RCSB PDB) (Parkin *et al.*, 1996). Rechts: Schematische Darstellung der Cysteinverbrückungen in Inhibitoren des Kunitz-Typs (Laskowski Jr. und Kato, 1980; Walden, 2002).

BPTI ist der am besten untersuchte Vertreter der Kunitz-Inhibitoren (Walden, 2002). Seine physiologische Funktion liegt hauptsächlich in der Inhibierung der Zymogen-aktivierenden Protease Trypsin bzw. dessen Vorstufe Trypsinogen. Dies unterbindet eine übermäßige Ausschüttung von aktiven Verdauungsenzymen. Aber auch Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein werden durch

BPTI inhibiert. Unter Ausbildung eines stabilen, pilzförmigen Komplexes bindet BPTI an das aktive Zentrum von Trypsin (Serin 195) und verhindert so dessen vorzeitige Enzymaktivität, die katalytische Triade, bis Trypsin im Organismus zu seinem Bestimmungsort, dem Gastrointestinaltrakt, gelangt ist. Dies dient dem Schutz des körpereigenen Gewebes im Pankreas vor „Selbstverdauung“ durch die eigenen Verdauungsenzyme (Goodsell, 2003; Koolman und Röhm, 2003). Das aktive Zentrum des BPTI ist, wie bei allen Kunitz-Inhibitoren, in einer exponierten Schleife der Tertiärstruktur gelegen (Walden, 2002). Im Fall von BPTI befindet es sich zwischen den Aminosäuren Lysin 15 und Alanin 16. Um die eigene Spaltung durch Trypsin zu verhindern und dieses spezifisch zu inhibieren, liegt das aktive Zentrum in einer gewissen Entfernung zum reaktiven Serin 195 des Trypsins (Dittrich und Kanchanawarin, 2011).

BPTI wurde bereits ausgiebig als Modellsubstrat für Faltungsstudien und zur Untersuchung von Protein-Wechselwirkungen eingesetzt (Panse *et al.*, 2001; Ascenzi *et al.*, 2003). Da seine Stabilität direkt mit der Ausbildung der drei Disulfidbindungen verknüpft ist, führt eine Reduktion dieser Verbrückungen schon bei Raumtemperatur zur Entfaltung des Proteins und somit zum Verlust des inhibitorischen Potenzials (Anderer und Hörnle, 1966).

In vivo weist das Chaperon SecB zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels eine hohe Spezifität für sekretorische Präproteine auf. *In vitro* verliert sich diese Substratspezifität jedoch und SecB bindet auch bereitwillig an kleine Substrate, die nur geringe repulsive Wechselwirkungen (Leinisch, 2005) aufweisen. BPTI wurde daher bereits in früheren Studien (Panse *et al.*, 2001) als Modellsubstrat für SecB verwendet. Um BPTI in einen bindungskompetenten Zustand für SecB zu überführen, welcher der naszierenden Polypeptidkette *in vivo* gleichzusetzen ist, wurde in dieser Arbeit einerseits der Ansatz einer chemischen Modifizierung des nativen Modellsubstrats und andererseits die gezielte Mutation aller Cysteine gewählt.

1.4 EPR-Spektroskopie

Die spektroskopische Methode der *Electron Paramagnetic Resonance*, kurz EPR, ist eine zerstörungsfreie Messmethode, die ähnlich der Kernresonanz (NMR), auf der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und magnetischen Momenten beruht. Während mit der NMR-Spektroskopie magnetische Momente der Kerne untersucht werden, basiert die EPR-Spektroskopie auf der Untersuchung von magnetischen Momenten der Elektronen, verursacht durch deren Elektronenspin. Mit ihrer Hilfe können paramagnetische Substanzen, d. h. Verbindungen mit ungepaarten Elektronen, wie Radikale oder Metallionen (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}), untersucht werden (Schweiger, 2003). Zur Untersuchung nicht paramagnetischer Proben können beispielsweise Spin-Marker (*Spinlabel*) als EPR-aktive Reportergruppen beigemischt oder kovalent an die Probe gebunden werden. Dabei ist immer darauf zu achten, dass das zu untersuchende System dadurch nicht dermaßen beeinträchtigt wird, dass keine übertragbaren Informationen mehr gewonnen werden können. Die kovalente Bindung stabiler paramagnetischer Zentren, beispielsweise Nitroxid-Radikale, an definierte Positionen im zu untersuchenden Molekül wird dabei als *Site-directed Spinlabeling* bezeichnet. Zur Untersuchung von Proteinen können Spinlabel so an die im Protein natürlich auftretenden Cysteine gebunden werden (Zhou *et al.*, 2000). In den vergangenen Jahren hat man sich die Technik der ortsgerichteten Mutagenese zu Nutze gemacht, um gezielt Cysteine an den zu untersuchenden Positionen in Proteine einzuführen (Hubbell und Altenbach, 1994). Auf diese Weise ist es mit Hilfe der EPR-Spektroskopie möglich, Aufschluss über die Struktur und Dynamik von Proteinen sowie Protein-Wechselwirkungen zu erlangen (Berliner und Reuben, 1989). Das Spinlabel 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- Δ^3 -pyrrolidin-3-methylthiosulfonat (MTS) ist aufgrund seines kleinen Volumens und seiner hohen Spezifität für Thiolgruppen besonders gut für die Modifizierung von Cysteinen geeignet (Berliner *et al.*, 1982) und wurde daher für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente verwendet (vgl. Abb. 3.3.1).

Die zeitliche Auflösung der EPR-Spektroskopie beträgt 10 - 100 ns und die Nachweisgrenze liegt bei ca. 10^{11} Spins/0,1 mT Linienbreite (minimale Konzentration: $\sim 10^{-9}$ M; Probenvolumina: Mikroliter-Mengen). Aufgrund des günstigeren Boltzmann-Faktors ist die Nachweisempfindlichkeit der EPR höher als diejenige der NMR (Schweiger, 2003). Des Weiteren erweist es sich für biologische Systeme als durchaus vorteilhaft, dass, im Gegensatz zu optischen Verfahren (UV/Vis), mit Hilfe der EPR- und NMR-Spektroskopie auch trübe Lösungen vermessen werden können.

1.4.1 Theoretische Grundlagen

Neben Ruhemasse und Ladung besitzt jedes Elektron noch eine weitere fundamentale Eigenschaft, den Spin s . Bei diesem handelt es sich um einen quantenmechanischen Eigendrehim-

puls. Der Elektronenspin besitzt die Quantenzahl $s = 1/2$ und den Betrag $|s| = \hbar\sqrt{s(s+1)}$ ($\hbar = h/2\pi$; h : Planck'sches Wirkungsquantum). Seine Projektion auf die z -Achse, d. h. die Richtung des von außen angelegten magnetischen Felds, beträgt $m_s\hbar$, wobei die magnetische Spinquantenzahl m_s je nach Orientierung die Werte $+\frac{1}{2}$ (α) und $-\frac{1}{2}$ (β) annehmen kann. Jeder Drehimpuls korreliert mit einem magnetischen Moment μ und somit ergibt sich für den Elektronenspin:

$$\mu_E = \gamma_E \cdot s. \quad (1.1)$$

Hierbei ist $\gamma_E = -\frac{g_E \cdot e}{2m_e}$ das gyromagnetische Verhältnis des Elektrons. e ist die Elementarladung, m_e die Ruhemasse des Elektrons und g_E der Landé-Faktor, dessen Wert für ein freies Elektron 2,00232 beträgt. Betrachtet man nun die z -Komponente des magnetischen Moments μ_E^z , erhält man unter Einbeziehung des Bohr'schen Magnetons $\mu_B = \frac{e\hbar}{2m_e}$:

$$\mu_E^z = -m_s \cdot g_E \cdot \mu_B. \quad (1.2)$$

Die Spinzustände $m_s = \pm\frac{1}{2}$ sind in Abwesenheit eines äußeren Magnetfelds entartet. Wird ein solches Feld mit einer Stärke B_0 in z -Richtung angelegt, treten Feld und magnetisches Moment μ_E^z in Wechselwirkung, wodurch die Entartung beider Spinzustände aufgehoben wird. Dieses Phänomen wird nach seinem Entdecker als „Zeeman-Effekt“ bezeichnet. Die Wechselwirkungsenergie ist dann gegeben durch:

$$E = -\mu_E^z \cdot B_0 = m_s \cdot g_E \cdot \mu_B \cdot B_0. \quad (1.3)$$

Die Energiedifferenz ΔE zwischen den beiden Spinzuständen $m_s = \pm\frac{1}{2}$ beträgt folglich

$$\Delta E = E_1 - E_2 = g_E \cdot \mu_B \cdot B_0, \quad (1.4)$$

wie in Abb. 1.4.1 verdeutlicht wird. Die Auswahlregel für erlaubte Übergänge lautet $\Delta m_s = \pm 1$ für ein freies Elektron.

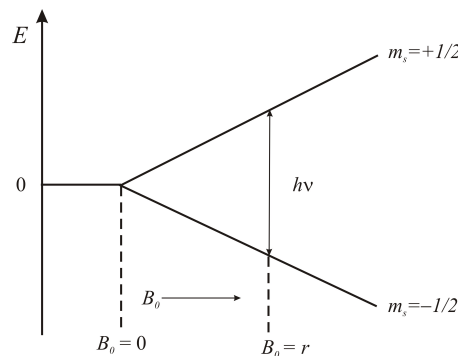


Abb. 1.4.1: Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus eines Eielektronensystems im homogenen Magnetfeld B_0 . In Anlehnung an (Wertz und Bolton, 1972).

Im EPR-Experiment werden Übergänge zwischen verschiedenen Energieniveaus induziert, indem die Elektronen mit einer elektromagnetischen Welle der richtigen Frequenz ν bestrahlt werden. Diese Frequenz ist durch die Resonanzbedingung

$$h\nu = \Delta E = g_E \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (1.5)$$

gegeben. Die Resonanz im Molekül ist von der des freien Elektrons verschieden. Diese Abweichungen werden über den sogenannten g-Faktor

$$g = (1 - \sigma)g_E \quad (1.6)$$

mit der Abschirmkonstante σ beschrieben, der die Abweichung gegenüber dem g_E -Wert für ein freies Elektron charakterisiert. Diese Abweichungen werden durch Kopplungen zwischen Spin- und Bahnmoment der Elektronen im Molekül verursacht (Göpel und Ziegler, 1994). Damit gilt:

$$\Delta E = h\nu = g \cdot \mu_B \cdot B_0. \quad (1.7)$$

Typische Spektrometer arbeiten im Tesla-Bereich (3 400 G/X-Band) und damit liegen die Resonanzfrequenzen im Mikrowellen (GHz)-Bereich (9,5 GHz). Bei EPR-Messungen im *Continuous Wave* (CW)-Betrieb wird die eingestrahlte Frequenz konstant gehalten und die Stärke des Magnetfelds variiert.

1.4.2 Die Hyperfeinstruktur

Nach den bisherigen Überlegungen sollte man im EPR-Spektrum eines Radikals nur eine einzelne Linie erwarten, die dem Übergang von $m_s = +\frac{1}{2}$ nach $m_s = -\frac{1}{2}$ entspricht. Typischerweise beobachtet man jedoch mehr als eine Linie, die sogenannte Hyperfeinstruktur. Diese resultiert aus der Wechselwirkung der Elektronen mit den magnetischen Momenten der Atomkerne (Wedler, 1997) und ist unabhängig von der Stärke B_0 des äußeren Magnetfelds. Jedem Kernspin ist ein magnetisches Feld zugeordnet, das sich vektoriell zum äußeren B_0 -Feld der Elektronen addiert. Das lokale Feld B_{lok} der Elektronen ist damit:

$$B_{\text{lok}} = B_0 + am_I. \quad (1.8)$$

Hierbei ist m_I die magnetische Kernspinquantenzahl und a die Hyperfeinkopplungskonstante, welche die Dimension eines Magnetfelds besitzt und dem Abstand der Linien im Spektrum entspricht. Ein Kern mit der Spinquantenzahl I spaltet eine EPR-Linie in $(2I + 1)$ Hyperfeinlinien auf und es gilt die Auswahlregel $\Delta m_I = 0$. Für einen Kernspin $I = 1$, wie er im ^{14}N -Kern eines

Nitroxid-Radikals vorkommt, ergibt sich demzufolge eine Aufspaltung in drei Linien. Dies ist in Abb. 1.4.2 veranschaulicht.

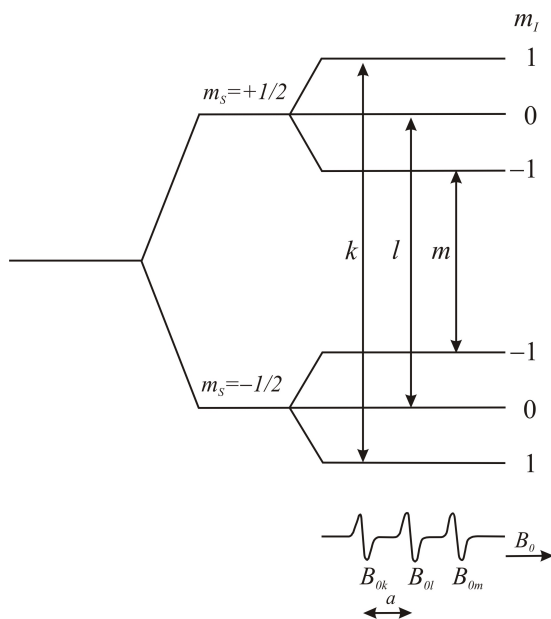


Abb. 1.4.2: Aufspaltung des EPR-Signals durch Hyperfeinwechselwirkung des Elektrons mit einem Kern der Spinquantenzahl $I = 1$. In Anlehnung an (Wertz und Bolton, 1972).

1.4.3 Spektren immobilisierter Proben und Abstandsmessungen

Kleine Spinlabel-Moleküle können sich in Lösung schnell und beliebig um ihre eigene Achse drehen. In solchen Fällen ist die Rotationskorrelationszeit kleiner als die Zeit, welche für den Absorptionsprozess und die Relaxationszeit im angeregten Zustand benötigt wird. Dadurch mittelt sich die Anisotropie der Hyperfeinkopplungskonstante a und die des g -Faktors heraus, und das Spektrum wird unabhängig von der Orientierung zum angelegten Magnetfeld B_0 . Somit ergeben sich die als isotrop bezeichneten Mittelwerte von Hyperfeinkopplungskonstante a und g -Faktor zu:

$$a_0 = 1/3(a_{xx} + a_{yy} + a_{zz}), \quad (1.9)$$

$$g_0 = 1/3(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}). \quad (1.10)$$

Die resultierenden isotropen Spektren weisen scharfe Linien auf.

Wird jedoch die freie Beweglichkeit des Spinlabels durch erhöhte Viskosität des Lösungsmittels bzw. sterische Hinderung oder durch niedrige Temperaturen (< 200 K) eingeschränkt, werden die Spektren aufgrund der verminderten Rotationsrate anisotrop. Die Einzelspektren aller intermediär orientierten Moleküle werden zeitlich nicht mehr ausgemittelt und es ergibt sich die Summe der einzelnen Signalamplituden. Dadurch verschieben sich die Absorptionslinien um den Wert ΔB und die Linienbreite im Spektrum erhöht sich. Die Auswirkung auf die feldhöchste Absorption (Hochfeld-Peak) ist hierbei am stärksten. Diese Vorgänge sind exemplarisch in Abb. 1.4.3 dargestellt.

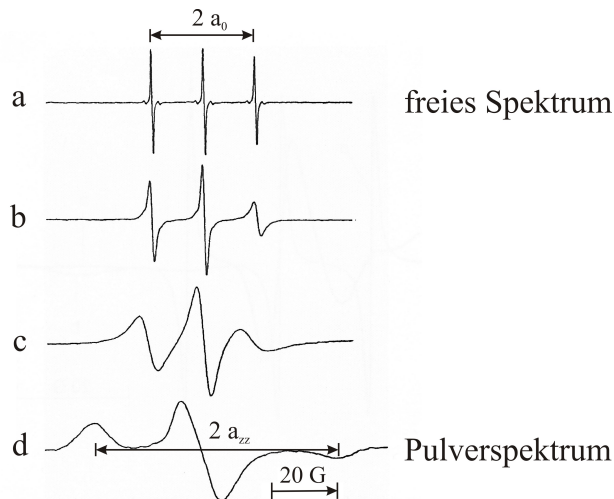


Abb. 1.4.3: Normierte EPR-Spektren von Di-*tert.*-butyl-nitroxid in Ethylenglykol bei (a) 25 °C, (b) – 25 °C, (c) – 80 °C, (d) – 150 °C (Griffith und Waggoner, 1969).

Mit Hilfe der spektralen Verschiebung ΔB ist es nach (Likhstenshtein, 1976) möglich, Abstandsinformationen (r_{AB}) zwischen zwei immobilisierten paramagnetischen Zentren eines beispielsweise doppelt spinmarkierten Proteins zu erhalten.

$$\Delta B = \pm \frac{3g_E\mu_B(3\cos^2\theta_{AB} - 1)}{4r_{AB}^3} \quad (1.11)$$

θ_{AB} beschreibt hierbei den Winkel zwischen den beiden Spinlabeln relativ zum angelegten äußeren Magnetfeld B_0 . Auf diese Weise können im CW-Betrieb Abstände im Bereich von 10 Å - 20 Å bestimmt werden (Steinhoff *et al.*, 1991).

1.4.4 Das *Continuous Wave* (CW)-Spektrometer

Ein EPR-Spektrometer ist im Wesentlichen aus Strahlungsquelle, Messraum und Detektionssystem aufgebaut. Als Strahlungsquelle dient ein Klystron oder eine Gunn-Diode, die elektromagnetische Strahlung im Mikrowellenbereich aussenden (ν : 9,5 GHz; λ : 3 cm) (Jeschke, 1998). Der Messraum besteht aus einem Hohlraumresonator (*Cavity*), dessen Abmessungen der Größenordnung der Wellenlänge des eingestrahlten Wechselfelds entsprechen, so dass sich dort bei geeigneter Geometrie und durch passende Ankopplung eine stehende Welle ausbildet. Dazu ist die Einstellung der exakten Frequenz notwendig; diese Abstimmung bezeichnet man als *Tuning*. Mikrowellensender, *Cavity* und Detektionssystem sind über eine Brückenschaltung verbunden, die häufig eine rechtwinklige Anordnung von Hohlleitern, ein sogenanntes „magisches T“ ist (vgl. Abb. 1.4.4). Die Mikrowelle wird in Arm 1 eingespeist und verteilt sich auf die Arme 2 und 4. In ersterem wird sie zum Hohlraumresonator geleitet und letzterer dämpft ihre Energie fast vollständig. Durch mechanische Ankopplung mittels Lochblende (Iris) kann die Impedanz (Wechselstromwiderstand) des Resonators derjenigen in der Zuleitung angepasst werden. So abgeglichen herrscht kein Energieaustausch zwischen Mikrowellenquelle und Resonator und es

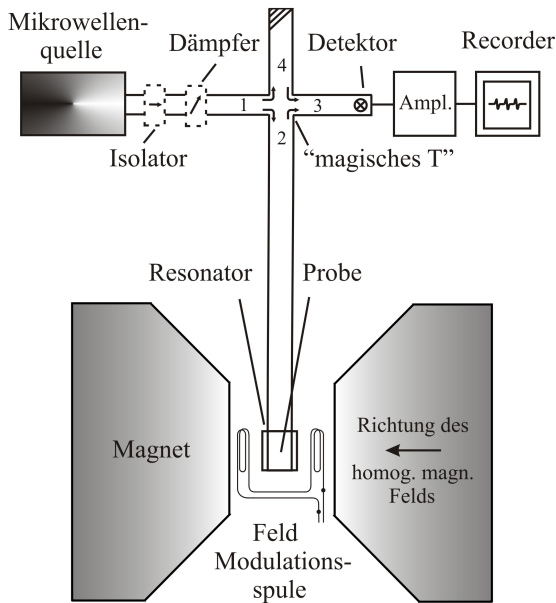


Abb. 1.4.4: Schematischer Aufbau eines CW-Spektrometers mit „magischem T“ (Haimann, 2006).

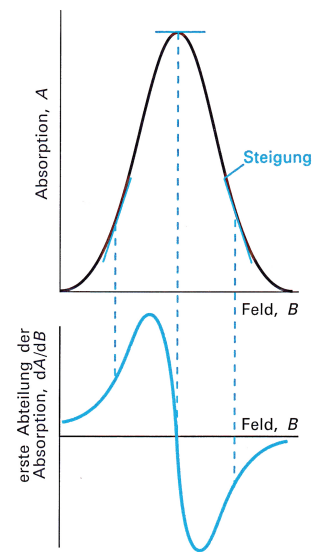


Abb. 1.4.5: Die phasenempfindliche Detektion registriert die erste Ableitung der Absorptionsintensität (Atkins, 2001).

findet keine Reflexion der Mikrowelle im Resonator statt. Der Resonator ist „kritisch gekoppelt“ (Jeschke, 1998). Wird nun bei fester Frequenz ein Übergang durch das sich ändernde Magnetfeld in Resonanz gebracht, tritt eine zusätzliche Absorption der Mikrowelle auf, und die Schaltung ist nicht mehr abgeglichen. Ein Teil der Mikrowelle wird in Arm 2 reflektiert und über das „magische T“ in Arm 3 geleitet, wo sie vom Detektor, meist eine Mikrowellendiode, als Messsignal detektiert wird.

Bei dieser Anordnung ist jedoch von Nachteil, dass das Rauschen über einen breiten Frequenzbereich in das Signal geht. Daher sind Spulen seitlich der *Cavity* angebracht, die ein zusätzliches Magnetfeld zum äußeren homogenen Magnetfeld B_0 generieren. Dies bewirkt eine Modulation des Signals, die typischerweise 100 kHz beträgt (Jeschke, 1998). Rauschen mit einer davon abweichenden Frequenz kann durch phasenempfindliche Detektion ausgeschlossen werden, was die Empfindlichkeit wesentlich erhöht. Man beobachtet nun die Änderung des Signals mit der Feldänderung, sprich die erste Ableitung des Absorptionsspektrums (vgl. Abb. 1.4.5).

Der Detektor, d. h. die Mikrowellendiode, sollte zur Wiedergabe unverfälschter Spektren linear arbeiten. Dieser lineare Bereich liegt in der Nähe des sogenannten Arbeitspunkts, so dass ein konstantes Grundsignal angelegt werden muss, damit sich die Diode auch ohne auftretende Resonanz an diesem Punkt befindet (Jeschke, 1998). Dies wird über den Referenzarm realisiert (in Abb. 1.4.4 nicht dargestellt), der Mikrowellen von der Quelle abzweigt und zum Detektor leitet. Ein im Referenzarm befindlicher Abschwächer ist so eingestellt, dass die Diode entsprechend ihres Arbeitspunkts Strom abgibt.

1.4.5 Gepulste EPR

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, ist die EPR-Spektroskopie traditionell eine CW (*Continuous Wave*)-Technik. Neben Detektion und Identifizierung freier Radikale und paramagnetischer Zentren können mit ihrer Hilfe, gegebenenfalls nach geeigneter Modifizierung der zu untersuchenden Systeme, ebenfalls Abstände zwischen Elektronenspins im Bereich von etwa $10 \text{ \AA} - 20 \text{ \AA}$ aus der dipolaren Linienverbreiterung der aufgezeichneten Spektren ermittelt werden.

Aufgrund des stetig wachsenden Interesses, auch größere Distanzen zwischen paramagnetischen Zentren in größeren (Bio-)Molekülen, wie z. B. Proteinen, messen und quantifizieren zu können, werden zunehmend gepulste EPR-Methoden angewandt. So sind beispielsweise Charakterisierung und Strukturaufklärung bislang nicht kristallisierbarer Proteine oder auch Untersuchungen zu Interaktionen verschiedener Biomoleküle möglich. Im Unterschied zur CW-EPR-Technik, bei der die eingestrahlte Mikrowellenfrequenz konstant gehalten und das Magnetfeld über den kompletten Messbereich durchfahren wird und dabei auftauchende Resonanzen der Probe detektiert werden, wirkt bei der Puls-EPR ein konstantes Magnetfeld jedoch kein kontinuierliches Mikrowellenfeld auf die zu untersuchende Probe. Stattdessen werden kurze, sehr starke Mikrowellenpulse mit einer bestimmten Frequenzbreite eingestrahlt. Die resultierenden Signale in der Zeitdomäne werden digitalisiert und nach Fourier Transformation (FT) wird das EPR-Spektrum in der Frequenzdomäne erhalten (Weber, 2005).

Die Methode der *Double Electron-Electron Resonance* (DEER), oder auch *Electron-Electron Double Resonance* (ELDOR) genannt, ist eine der möglichen gepulsten EPR-Techniken, um dipolare Wechselwirkungen und somit auch Abstände zwischen Elektronenspins zu untersuchen. Auf diese Weise können Distanzen zwischen $20 \text{ \AA} - 60 \text{ \AA}$, unter idealen Bedingungen auch bis zu 80 \AA , bestimmt werden. Erste Messungen wurden bereits vor 25 Jahren durchgeführt, aber erst durch die Einführung des 4-Puls-Experiments, welches Messungen ohne Totzeit ermöglicht (Pannier *et al.*, 2000), gewann diese Methode im Laufe des letzten Jahrzehnts bei der Untersuchung chemischer und biochemischer Systeme zunehmend an Bedeutung (Timmel, 2011).

1.4.5.1 ROTIERENDES KOORDINATENSYSTEM

Ein gebräuchliches Hilfsmittel, um die teils komplizierten Bewegungen der Probenmagnetisierung sowohl in der CW- als auch in der FT-EPR-Spektroskopie zu beschreiben, ist der Übergang vom stationären zu einem rotierenden Koordinatensystem (*rotating frame*). Hierbei rotiert das Laborsystem synchron mit dem magnetischen Feldvektor B_1 des Mikrowellenresonators bei einer resonanten Mikrowellenfrequenz der Winkelgeschwindigkeit ω_0 , die der Lamorfrequenz ω_L entspricht. Dadurch erscheint nicht nur die Komponente B_1 stationär, sondern ebenfalls alle magnetischen Komponenten, die mit der Lamorfrequenz präzedieren. Durch diesen Trick ist

ein vereinfachtes Verständnis der Bewegungsabläufe und der zu Grunde liegenden Mathematik möglich. Obwohl die auftretenden Prozesse im mikroskopischen Maßstab quantenmechanisch beschrieben werden können, ist es so mit Hilfe der klassischen Mechanik ebenfalls möglich, ein verständliches, qualitatives Bild der Magnetisierung in der Probe zu erhalten (Weber, 2005).

1.4.5.2 Double Electron-Electron Resonance (DEER)

Die Bestimmung des Abstands zwischen zwei paramagnetischen Zentren mit Hilfe von magnetischen Resonanztechniken ist durch die proportionale Abhängigkeit der Dipol-Dipol Kopplung ω_{dd} zweier Spins A und B vom Kehrwert des Abstands in dritter Potenz r_{AB}^{-3} möglich (Jeschke, 2002a; Jeschke und Polyhach, 2007). Ferner ist die dipolare Wechselwirkung abhängig vom Winkel θ_{AB} zwischen dem Abstandsvektor r_{AB} der koppelnden Elektronenspins und dem angelegten magnetischen Feld B_0 (Jeschke, 2002b). Sie kann durch Gleichung 1.12 beschrieben werden. Handelt es sich bei den paramagnetischen Zentren um stabile Nitroxid-Radikale, können diese als Punktdipole genähert werden (Jeschke, 2002b).

$$\omega_{dd}(r_{AB}, \theta_{AB}) = \frac{1}{r_{AB}^3} \frac{\mu_0 g_A g_B \mu_B^2}{2h} (3 \cos^2 \theta_{AB} - 1) \quad (1.12)$$

Hierbei sind g_A und g_B die g-Werte der jeweiligen paramagnetischen Spezies, μ_0 die magnetische Feldkonstante, μ_B das Bohr'sche Magneton und h das Planck'sche Wirkungsquantum. Übersteigt der Abstand zwischen diesen Spinlabeln 20 \AA , so ist ihre Dipol-Dipol Kopplung viel kleiner als die inhomogene Linienbreite im EPR-Spektrum, die durch nicht aufgelöste Hyperfeinkopplungen und g-Anisotropie verursacht wird. Daher muss die dipolare Wechselwirkung von diesen größeren Beiträgen separiert werden (Jeschke und Polyhach, 2007). Dies kann, wie nachfolgend beschrieben, durch ein Elektronen Spin Echo (ESE)-Experiment realisiert werden.

Durch Einstrahlung einer zweiten Mikrowellenfrequenz ist eine spektrale Separation des dipolar wechselwirkenden Spinpaars in einen Observerspin A ($\omega_{mw}(A)$) und einen Pumpspin B ($\omega_{mw}(B)$) möglich. Observer- und Pumpspin können somit unabhängig voneinander beeinflusst werden. Die Bestimmung dieser Mikrowellenfrequenzen erfolgt durch ESE-Detektion (vgl. Abb. 1.4.6(A)). Der typische Frequenzunterschied $\Delta\omega$ beträgt $\sim 65 \text{ MHz}$ für Nitroxide. Die Separation der Spin-Spin Wechselwirkungen wird mit Hilfe einer Echo-Sequenz auf den Observerspin A realisiert, die zunächst alle Wechselwirkungen refokussiert. Der anschließende Pumpimpuls π_B auf den Spin B invertiert das lokale Magnetfeld des Spins A (vgl. Abb. 1.4.6(B)) und stellt die Spin-Spin Kopplung wieder her (Junk, 2010).

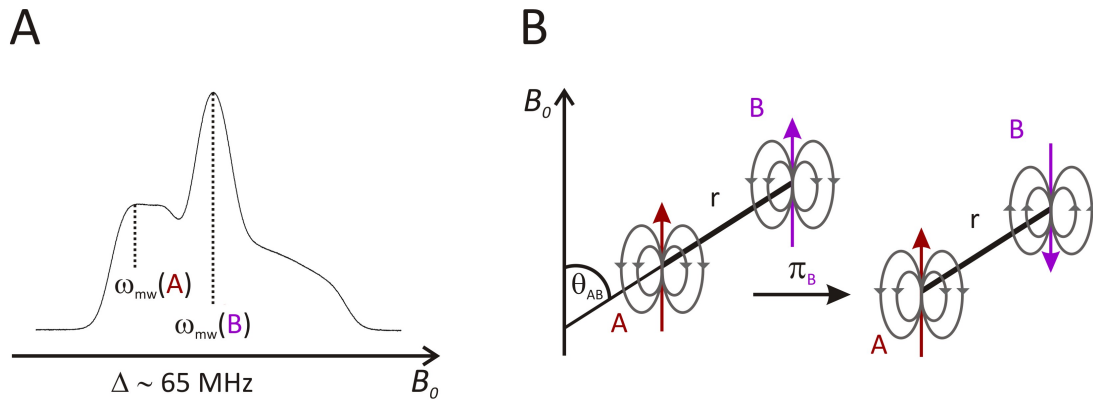


Abb. 1.4.6: (A) Schematisches ESE-Spektrum eines Nitroxid-Radikals zur Bestimmung von Observer- und Pumpfrequenz. (B) Schematische Darstellung der Änderung des lokalen Magnetfelds des A-Spins durch einen π_B -Pumpimpuls auf den B-Spin. In Anlehnung an (Junk, 2010).

Die Pulssequenz des DEER-Experiments ist schematisch in Abb. 1.4.7(A) dargestellt. Durch eine Echo-Sequenz auf den Observerspin A wird das primäre Echo (sog. Hahn-Echo) nach der Zeit $2\tau_1$ generiert. Dies dient, wie bereits erwähnt, der Refokussierung aller Wechselwirkungen, einschließlich der Spin-Spin Kopplung. Im Detail kommt es nach dem ersten $\pi/2$ -Puls zu einer Verkippung der Magnetisierung aus dem thermischen Gleichgewicht der $+z$ -Ebene um 90° in die $-y$ -Ebene (vgl. Abb. 1.4.8). In der Zeit $\tau_{m=1}$ können die einzelnen Spinpakete, die alle unterschiedliche Larmorfrequenzen aufweisen, frei präzedieren. Durch destruktive Interferenzen kommt es zum Verlust an transversaler Magnetisierung. Die Spinpakete fächern sich in der x,y -Ebene auf (Weber, 2005). Der anschließende π -Puls führt zu einer 180° Inversion der Magnetisierungslaufrichtung um die x -Achse. Hierbei bleiben Laufrichtung und -geschwindigkeit der Spinpakete in der x,y -Ebene erhalten. Nach der Zeit $\tau_{n=1}$ schließen daher alle Spinpakete wieder miteinander in $+y$ -Richtung auf und nach der Zeit $2\tau_1$ entsteht das refokussierte primäre Elektronen Spin Echo.

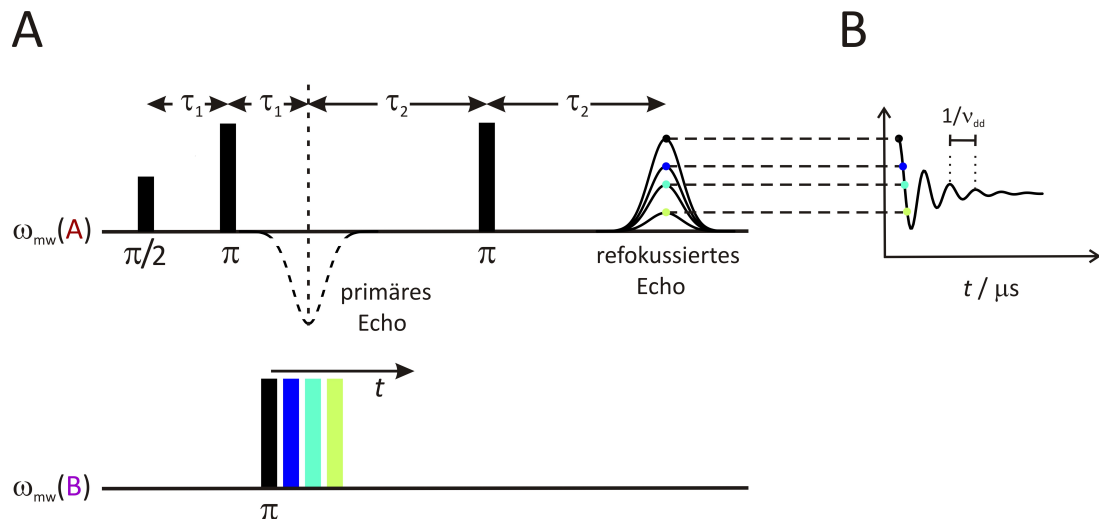


Abb. 1.4.7: (A) Schematische Darstellung der 4-Pulssequenz während der DEER-Messung und Modulation des refokussierten Echos durch zeitliche Variation t des π -Pumpimpuls. In Anlehnung an (Jeschke und Polyach, 2007). (B) DEER-Signal des 4-Puls-Experiments in der Zeitdomäne.

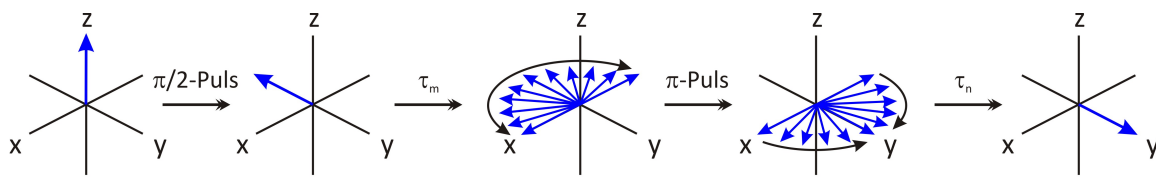


Abb. 1.4.8: Schematische Darstellung der Magnetisierungsvektoren des Observerspins A während des $\pi/2$ - und π -Pulses im 4-Puls-Experiment.

Ein π -Puls in der Pumpfrequenz führt ganz analog zur Inversion des B-Spins (Abb. 1.4.7(A)). Dies verursacht wiederum ein verändertes lokales Magnetfeld am Observerspin A. In der darauffolgenden Zeit τ_2 relaxiert das System. τ_2 wird daher als dipolare Evolutionszeit bezeichnet. Durch einen zweiten π -Puls in der Observerfrequenz wird schließlich ein zweites refokussiertes Echo nach der Gesamtzeit $2(\tau_1 + \tau_2)$ generiert, dessen Signal aufgezeichnet wird. Durch Variation der zeitlichen Verzögerung t zwischen dem π -Pumpimpuls und dem zweiten π -Observerpuls kommt es zu einer dipolaren Modulation der refokussierten Echoamplitude (vgl. Abb. 1.4.7(B)), die durch Gleichung 1.13 beschrieben werden kann (Schweiger und Jeschke, 2001; Reichenwallner, 2011).

$$V_{\text{DEER}}(r_{\text{AB}}, \theta_{\text{AB}}, t) = 1 - \int_0^{\pi/2} \sin\theta_{\text{AB}} \lambda(\theta_{\text{AB}}) [1 - \cos(\omega_{\text{dd}}(\theta_{\text{AB}})t)] d\theta_{\text{AB}} \quad (1.13)$$

λ_{AB} ist der orientierungsabhängige Modulationstiefenparameter. Für Nitroxide bei X-Band Frequenzen besteht keine ausgeprägte Orientierungsauswahl und λ_{AB} wird als orientierungsunabhängig betrachtet (Junk, 2010). Jeder Durchlauf der Pulssequenz ergibt somit einen Messpunkt

im DEER-Signal. Die zeitliche Dauer je Durchlauf wird als *short repetition time* bezeichnet. Die Modulation der DEER-Echoamplitude wird von einem exponentiellem Hintergrundsignal überlagert (nicht dargestellt). Erstere wird hierbei als intramolekulare Komponente betrachtet und das exponentielle Hintergrundsignal wird durch Überlagerung von dipolaren Kopplungen mit anderen Elektronenspins der Probe außerhalb des betrachteten Moleküls verursacht. Daher stellt dieses Signal die intermolekulare Komponente $V_{\text{DEER}}^{\text{inter}}(t)$ des DEER-Signals dar. Durch Multiplikation beider Komponenten ergibt sich das gesamte experimentelle DEER-Spektrum in der Zeitdomäne (Junk, 2010; Reichenwallner, 2011).

$$V_{\text{DEER}}^{\text{gesamt}}(r_{\text{AB}}, \theta_{\text{AB}}, t) = V_{\text{DEER}}^{\text{inter}}(t) \cdot V_{\text{DEER}}(r_{\text{AB}}, \theta_{\text{AB}}, t) \quad (1.14)$$

Der große Vorteil der 4-Puls-Methode liegt darin, dass es durch den zweiten refokussierenden π -Puls auf den Observerspin A zu einer konstruktiven Interferenz der makroskopischen Magnetisierung kommt. Dies führt zu einem zeitlich verzögerten Spin-Echo (Hahn, 1950), welches die Detektion des EPR-Signals außerhalb der Totzeit τ_{R} , die nach Einstrahlen des ersten Observerpulses auftritt, ermöglicht.

Eine Fourier Transformation des DEER-Signals in der Zeitdomäne führt zu einem sogenannten Pake-Pattern in der Frequenzdomäne (vgl. Abb. 1.4.9).

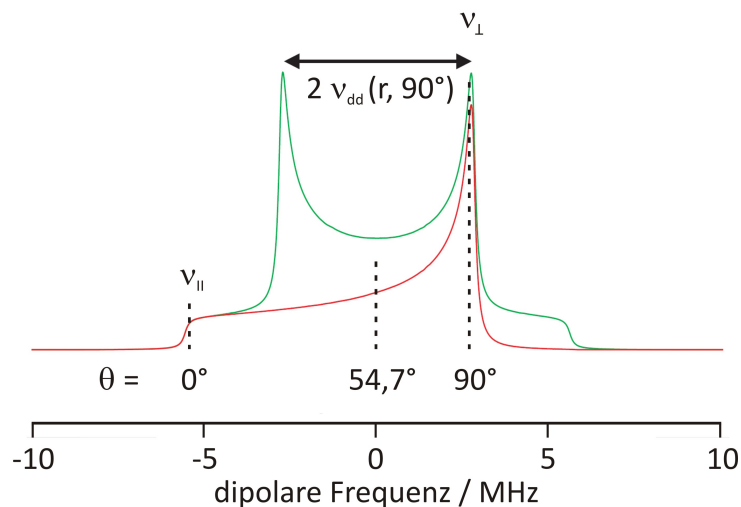


Abb. 1.4.9: Grün: Pake-Pattern zweier Dipole in der Frequenzdomäne mit den charakteristischen Peaks bei $\pm v_{\text{dd}}$. Rot: Winkelabhängigkeit θ eines der beiden Übergänge im Pake-Pattern. In Anlehnung an (Weber, 2006; Junk *et al.*, 2010b).

Der Abstand r_{AB} zwischen den paramagnetischen Zentren lässt sich mit Hilfe von Gleichung 1.12 direkt aus den Positionen der beiden Spitzen des Pake-Patterns über die Beziehung $\omega_{\text{dd}} = 2\pi \cdot v_{\text{dd}}$ berechnen. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass es sich um eine schmale Abstandsverteilung handelt und dass der Abstand $r_{\text{AB}} > 20 \text{ \AA}$ ist und somit Austauschwechselwirkungen vernachlässigbar gering werden.

Für die Gewinnung von Abstandsinformationen aus breiten oder komplizierteren Abstandsverteilungen mit Hilfe der DEER-Daten wird ein mathematisches Faktorisierungsverfahren herangezogen (Junk, 2010). Das sphärische Volumen um den Observerspin wird gedanklich in dünne Schalen unterteilt. Die Wahrscheinlichkeit, in einer solchen Schale der Dicke dr einen B-Spin im Abstand r vom Observerspin A anzutreffen, liegt bei $4\pi r^2 dr G(r)$. $G(r)$ ist hierbei die gesuchte Abstandsverteilung (Jeschke, 2002b). Das normierte DEER-Signal ist dann durch Gleichung 1.15 gegeben (Jeschke *et al.*, 2002), wobei $V_r(r,t)$ das DEER-Zeitdomänensignal innerhalb einer bestimmten dünnen Schale bezeichnet.

$$\ln \frac{V_{\text{DEER}}(t)}{V_{\text{DEER}}(0)} = -4\pi\lambda \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} r^2 G(r) (1 - V_r(r,t)) dr \quad (1.15)$$

Diese Gleichung kann gelöst werden, indem die dipolare Modulation so lange mit variierenden Abstandsverteilungen simuliert wird, bis die experimentelle Zeitspur hinreichend angenähert ist (Junk, 2010). Die direkte Berechnung der Abstandsverteilung aus den Daten der Zeitdomäne ist ebenfalls möglich. Da hier allerdings kleine Verzerrungen des experimentellen Signals zu großen Auswirkungen auf die Abstandsverteilung führen können, gilt Gleichung 1.15 als „unterbestimmt“ (Jeschke, 2002b; Jeschke und Polyhach, 2007). Mit Hilfe einer Tikhonov Regularisierung kann dieses Problem gelöst werden (Jeschke *et al.*, 2004b). Dieser Algorithmus ist im Programmpaket DeerAnalysis2006 (Jeschke *et al.*, 2006) implementiert, welches zur Analyse der DEER-Daten dieser Arbeit angewandt wurde.

Die untere Auflösungsgrenze der DEER-Technik ist durch die Anregungsbandbreite des Pumpulses gegeben. Sie liegt bei $\sim 15 \text{ \AA}$. Die obere Grenze wird durch die maximal aufnehmbare dipolare Evolutionszeit, d. h. τ_2 limitiert. Für eine eindeutige Abstandsbestimmung müssen mindestens $5/8$ der Modulation aufgezeichnet werden. Unter optimalen Bedingungen in Modellsystemen können Evolutionszeiten τ_2 von $6 \mu\text{s}$ und maximale Abstände von 80 \AA aufgelöst werden. Für biologische Systeme im wässrigen Milieu sind Zeiten von $2,5 \mu\text{s}$ und ein Abstand in der Größenordnung von 60 \AA realistische Werte (Jeschke, 2002b; Junk, 2010).

2 Problemstellung

SecB ist, wie zuvor bereits beschrieben, ein homotetrameres Chaperon, das die cytoplasmatische Komponente des Sec-abhängigen Translokationswegs in *E. coli* verkörpert (Randall *et al.*, 1998). Auf diesem Weg wird ein Teil der neu synthetisierten Proteine vom Cytosol ausgehend ins Periplasma und zur äußeren Membran exportiert (den Blaauwen und Driessen, 1996; Driessen *et al.*, 1998; Hardy und Randall, 1989). Hierbei verhindert SecB die vorzeitige Faltung oder Aggregation dieser periplasmatischen Proteine bevor sie die Membran-Barriere überschreiten und hält somit die naszierenden Polypeptidketten in einem translokationskompetenten Zustand. *In vitro* wechselwirkt SecB mit einer Vielzahl von Proteinen, die im nicht-nativen Zustand vorliegen (Lecker *et al.*, 1990; Hardy und Randall, 1991; Fekkes *et al.*, 1995; Panse *et al.*, 1998). Der *bovine pancreatic trypsin inhibitor* (BPTI) wurde bereits ausgiebig als Modellsubstrat für Faltungsstudien eingesetzt. Er besteht aus 58 Aminosäuren und seine Struktur wird durch drei Disulfidbrücken zwischen den Aminosäurepositionen 5 und 55, 14 und 38 sowie 30 und 51 stabilisiert. Die Stabilität des BPTI ist direkt mit der Ausbildung dieser drei Disulfidbindungen verknüpft und eine Reduktion dieser Brücken führt zu einer Entfaltung des Proteins.

In den letzten Jahrzehnten wurde die Technik der EPR-Spektroskopie in Verbindung mit *Site-directed Spinlabeling* zunehmend zur Aufklärung molekularer und globaler Strukturen von Proteinen sowie deren lokaler Dynamik eingesetzt (Berliner *et al.*, 2000; Hubbell *et al.*, 2000; Steinhoff, 2004; Fajer, 2005; Jeschke und Polyhach, 2007). Die Spinmarkierung von Proteinen oder Substraten in einem Protein-Substrat-Komplex mit Radikalfunktionen verursacht dabei nur minimale strukturelle Störungen und ermöglicht eine ortsspezifische Charakterisierung der Biomakromoleküle. Aussagen über die Lösungsmittelzugänglichkeit der Spinlabel sowie deren Mobilität können hierbei durch *Continuous Wave* (CW)-EPR-Spektroskopie erhalten werden. Mit dieser Methode kann die lokale Struktur mehrfach spinmarkierter Proteine bis hin zu einem Abstand von 20 Å zwischen den Spinlabeln untersucht werden. Puls-EPR-Techniken, wie beispielsweise die *Double Electron-Electron Resonance* (DEER)-Spektroskopie, können Entfernungen von bis zu 60 Å zwischen ungepaarten Elektronen-Spins auflösen. Unter völlig optimierten Bedingungen sind sogar Abstände bis 80 Å möglich. In den letzten Jahren wurde die DEER-Technik daher verstärkt zur Untersuchung globaler Strukturen von Biomakromolekülen wie (Membran-) Proteinen, Peptiden und Nukleinsäuren genutzt (Schiemann *et al.*, 2004; Bennati *et al.*, 2005; Hilger *et al.*, 2007; Milov *et al.*, 2007; Smirnova *et al.*, 2007; Junk *et al.*, 2010a; Akdogan *et al.*, 2011).

Eine frühere Studie, die darauf abzielte die Konformation der Substrate des SecB zu untersuchen, ergab Hinweise auf eine Konformationsänderung im Chaperon SecB selbst, die während der Bindung des Modellsubstrats BPTI auftrat. Dabei deuteten Änderungen in CW-EPR Spektren eines spinmarkierten Derivats auf eine mögliche Verbreiterung der Quartärstruktur von SecB hin

(Panse *et al.*, 2001). Allerdings gab es keinen eindeutigen Beweis dafür, dass die Spinmarkierung nur an den Cysteinen der Positionen 97 in jeder der vier Untereinheiten der SecB-Mutante erfolgt war.

Daher ist es Ziel dieser Arbeit, die in SecB auftretenden Konformationsänderungen nach Bindung des entfalteten Modellsubstrats BPTI genauer zu untersuchen und zu quantifizieren, um so mögliche Rückschlüsse auf die strukturellen Veränderungen im Chaperon bei der Substratbindung ziehen zu können. Dazu müssen in einem ersten Schritt SecB-Mutanten generiert werden, die nur noch ein einziges reaktives Cystein pro monomerer Untereinheit enthalten, um somit einen eindeutigen und spezifischen Ankerpunkt für chemische Modifizierungen zu schaffen. Diese Mutanten werden charakterisiert sowie eine geeignete Isolierungs- und Aufarbeitungsmethode im Arbeitskreis etabliert. Weiterhin ist es notwendig, eine quantitative Spinmarkierung an jeder der SecB-Untereinheiten zu realisieren und verifizieren.

Das Modellsubstrat BPTI soll durch chemische Modifizierungen im Protein in einen translokationskompetenten Zustand für SecB überführt werden und weiterführend der Versuch unternommen werden, diese chemische Modifizierung zu umgehen, indem eine rekombinante Cystein-freie Variante des Modellsubstrats mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden erzeugt und isoliert wird.

Es sollen Bedingungen ermittelt werden, unter denen es zur Ausbildung eines Chaperon-Substrat-Komplexes zwischen den SecB-Mutanten und dem Modellsubstrat kommt und dieser nachgewiesen werden.

Mit Hilfe von molekulardynamischen (MD) Rechnungen können, ausgehend von der entsprechend modifizierten Kristallstruktur, Abstände zwischen den jeweiligen Positionen im SecB-Tetramer berechnet werden. Die so theoretisch ermittelten Abstände sollen mit den experimentell zu bestimmenden Abständen verglichen werden und eine Zuordnung dieser Abstände ermöglichen.

Unter diesen Voraussetzungen können in einem abschließenden Teil dieser Arbeit EPR-spektroskopische Untersuchungen mit unterschiedlichen Messtechniken zur Analyse der lokalen Umgebungsänderung der Spinlabel und Abstandsänderung zwischen Spinlabeln in substratgebundenen und substratfreien Chaperonsystemen durchgeführt werden. Durch einen Vergleich mit den theoretisch bestimmten Abständen kann dabei die Güte der Messungen belegt werden und aus den Abstandsänderungen sind Rückschlüsse auf Konformationsänderungen in SecB möglich, um somit das Verhalten des Chaperons bei Substratbindung genauer zu charakterisieren.

3 Eigene Ergebnisse und Diskussion

3.1 Erzeugung der SecB-Mutanten

Panse beschreibt die Isolierung von rekombinantem SecB aus *E. coli* (Panse *et al.*, 1998). Hierbei erfolgte die Aufreinigung des Zelllysats durch zwei aufeinander folgende säulenchromatographische Schritte, einem Anionenaustausch mittels einer *fast flow* Q-Sepharose Säule unter Auftragung eines NaCl-Konzentrationsgradienten, gefolgt von einer nach dem Größenausschlussprinzip arbeitenden Gelfiltration über eine Sephacryl-S200 HR-Säule.

Um die Isolierung und Aufreinigung von SecB zu erleichtern und zeitsparender zu gestalten, wurde die genetische Information von SecB aus dem ursprünglichen Vektor in einen geeigneten Expressionsvektor umkloniert und die Isolierung und Aufreinigung des Proteins optimiert.

Ausgangspunkt für die gentechnischen Arbeiten waren die Gene des SecB-Wildtyps (WT) sowie die der SecB-Mutanten SecB E90C,C97,102A und SecB Q14C (erhalten von R. Varadarajan, Indian Institute of Science, Bangalore, Indien), die im Vektor pET-9a vorlagen. Außer dem SecB-Gen trägt dieser Vektor auch eine Kanamycinresistenz.

Die Nomenklatur der Mutanten spiegelt die Veränderungen in der Aminosäuresequenz im Vergleich zur Sequenz des SecB-Wildtyps wider. Dabei steht der erste Buchstabe für die in der Wildtyp-Sequenz vorkommende Aminosäure, die Zahlen für die jeweilige Position dieser Aminosäure und der nachfolgende Buchstabe für diejenige Aminosäure, gegen die erstere in der Mutante an dieser Position substituiert wurde. Im Fall von SecB E90C,C97,102A, nachfolgend kurz als SecB E90C bezeichnet, wurden also beispielsweise in allen vier Untereinheiten des Homotetramers die Glutaminsäuren (E) an Position 90 durch Cysteine (C) ersetzt und die in der nativen Sequenz enthaltenen Cysteine an den Positionen 97 und 102 gegen Alanine (A) ausgetauscht. Bei der Aminosäure an Position 90 handelt es sich um einen besonders exponierten, leicht zugänglichen Rest an der Peripherie des Proteins (vgl. Abb. 3.7.1 rechts, Seite 84 und Abb. 3.8.6, Seite 93). Vorangegangene Untersuchungen von Krishnan (Krishnan *et al.*, 2009) haben gezeigt, dass die Mutante E90C an dieser Position rasch und selektiv mit diversen Fluoreszenzlabeln markiert werden kann. Daher ist diese SecB-Mutante besonders interessant für die späteren Spinlabeling-Experimente (siehe Kap. 3.3.1, Seite 47).

3.1.1 Primerdesign

Bevor das jeweilige für SecB₁₋₁₅₅ codierende Gen-Segment aus dem ursprünglichen Vektor, pET-9a, ausgeschnitten werden konnte, musste ein geeigneter Expressionsvektor ausgewählt werden. Dieser sollte über geeignete Restriktionsschnittstellen zur Ligation mit der

SecB-Sequenz verfügen. Da die spätere Aufreinigung des isolierten Proteins mittels Nickel-Affinitätschromatographie in einem einzigen Säulenschritt erfolgen sollte, musste der neue Vektor ebenfalls einen carboxyterminalen 6x His-Tag, d. h. eine kurze Aminosäuresequenz bestehend aus sechs konsekutiven Histidinen und eine Thrombinschnittstelle tragen. Der Vektor pET-20b(+) weist die geforderten Charakteristika auf (vgl. Abb. A.1.1, Seite 155) und trägt eine Ampicillin-Resistenz. Es fehlte jedoch die zur späteren Abspaltung des 6x His-Tags benötigte Thrombinschnittstelle. Diese konnte aber durch eigens dafür geplante Primer in die Gen-Sequenz eingefügt werden.

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Clone Manager Suite 7 so entworfen, dass sie über einen geeigneten GC-Gehalt sowie eine ausreichend lange Überlappung mit der SecB-Matrize verfügten. Wie aus den Abb. 3.1.1 und 3.1.2 hervorgeht, wurde an das jeweilige 5'-Ende des SecB *forward*- und *reverse*-Primers eine Sequenz, bestehend aus den vier Schutzbasen „CACCC“, angehängt. Diese sind nötig, damit Restriktionsenzyme an den angrenzenden Restriktionsschnittstellen im weiteren Verlauf der Klonierung angreifen konnten. Im SecB *forward*-Primer folgt auf diese vier Schutzbasen die Sequenz der NdeI-Schnittstelle „CATATG“. Die letzten drei Basen der NdeI-Schnittstelle (ATG) bilden gleichzeitig das Startcodon und somit den Beginn der sich anschließenden ersten 37 zu SecB komplementären Basen. Im SecB *reverse*-Primer beinhaltet die XhoI-Schnittstelle das letzte Cytosin der vorgeschalteten Schutzbasen. Die dahinter liegende Thrombinschnittstelle und die vor der 32 Basen langen SecB-Sequenz eingefügten Basen wurden dem Vektor pET-15b entnommen und sind, ebenso wie das Ende der SecB codierenden Gensequenz, rückwärts und komplementär in den Primer eingefügt worden.

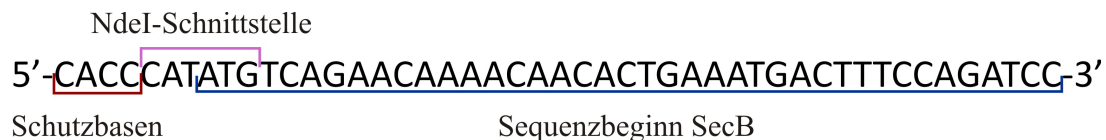


Abb. 3.1.1: Der SecB *forward* Primer (SecB_{for}NdeI) umfasst eine Schutzbasensequenz, die Schnittstelle für das Restriktionsenzym NdeI sowie den Beginn der genetischen Sequenz für SecB.

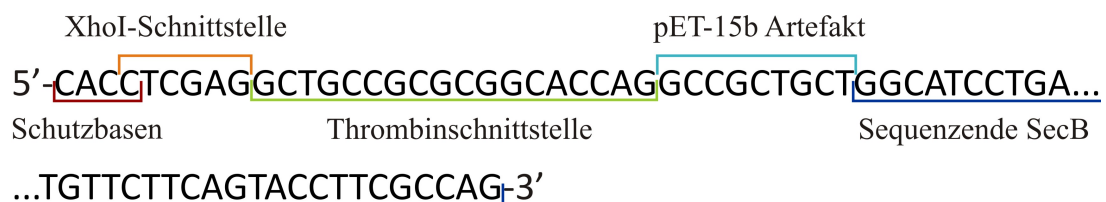


Abb. 3.1.2: Der SecB *reverse* Primer (SecB_{rev}XhoIthrombin) enthält ebenfalls eine Sequenz aus Schutzbasen, die Schnittstelle für das Restriktionsenzym XhoI, die Thrombinschnittstelle, eine kurze Artefaktsequenz des Vektors pET-15b sowie das Sequenzende des SecB-Gens.

3.1.2 Amplifizierung der SecB-Gene

Zur Vervielfältigung der SecB₁₋₁₅₅-Gene wurden die entsprechenden Plasmide aus vorhandenen Glycerinkulturen isoliert. Dazu wurden Verdünnungsausstriche auf kanamycinhaltigen LB-Agarplatten erstellt, die über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden mit den gewachsenen monoklonalen Kolonien 2xYTK-Übernachtskulturen inokuliert, aus denen nach Inkubation bei 37 °C, 200 rpm die Plasmide mit dem maxXbond™ Kit wie unter Abschnitt 5.3.4.8, Seite 127 beschrieben isoliert wurden. Mit Hilfe der zuvor beschriebenen Primer wurden die Gene der verschiedenen SecB-Mutanten mittels PCR aus dem Vektor pET-9a heraus amplifiziert. Dazu wurde das auf Seite 123 dargestellte PCR-Universalprogramm verwendet. Wie in Abb. 3.1.3 zu erkennen ist, verlief die Amplifizierung mit den designten Primern für alle drei SecB-Gene erfolgreich und ein 500 bp großes PCR-Produkt konnte mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden. Die amplifizierte Sequenz enthält die, einschließlich Startcodon, 468 Basen lange SecB-Sequenz sowie die über die Primer eingefügten Schnittstellen, so dass die berechnete Gesamtgröße des PCR-Produkts bei 508 bp liegt. Die amplifizierten Gene wurden dann für die weiteren Experimente eingesetzt.

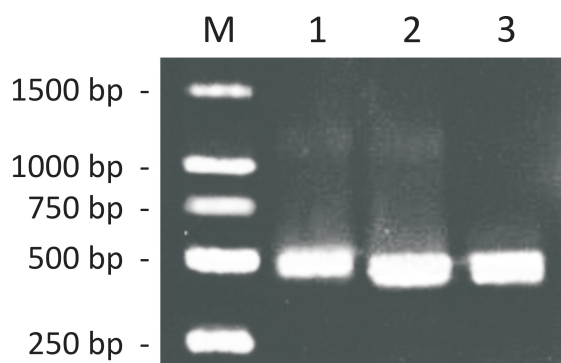


Abb. 3.1.3: 1,2%iges Agarosegel der PCR-Produkte der zu amplifizierenden SecB-Gene. Bahn M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; Bahn 1: SecB WT; Bahn 2: SecB E90C; Bahn 3: SecB Q14C.

3.1.3 Charakterisierung und Ligation der SecB-Gene

Bevor die SecB₁₋₁₅₅-Gene in den neuen Vektor pET-20b(+) einligiert werden konnten, wurde das genetische Material durch Sequenzierung charakterisiert. Dazu war es nötig, das PCR-Reaktionsprodukt von der verbleibenden Template-DNA, den Primern und der DNA-Polymerase zu befreien. Diese Aufreinigung wurde mit dem NucleoSpin® Extract II Kit durchgeführt und die Konzentration der gereinigten DNA photometrisch, wie unter Abschnitt 5.3.4.1, Seite 125 beschrieben, bestimmt. Die Sequenzierung der Proben wurde am „Institut für Immunologie und Genetik“ in Kaiserslautern mit den SecB *forward*- und *reverse*-Primern durchgeführt. Alle Sequenzen waren fehlerfrei und bestätigten die erfolgreiche Modifizierung der SecB-DNA mit den eingefügten Restriktions- und Proteaseschnittstellen.

Vor Ligation der SecB₁₋₁₅₅-Inserts in den Vektor pET-20b(+), wurden die jeweiligen Komponenten einem Doppelverdau mit den Typ II Restriktionsenzymen NdeI und XhoI unterzogen.

Dadurch wurde der Expressionsvektor an den vorgesehenen Ligationsstellen geöffnet. Außerdem wurden durch Abspaltung der noch an den 5'-Enden der SecB-Sequenzen befindlichen Schutzbasen die entsprechenden Ligationsbedingungen an den Inserts geschaffen, so dass die für die Ligation notwendigen korrekten *sticky ends* an Vektor und Insert vorlagen.

Nach Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen durch Inkubation bei 80 °C wurden die Verdauansätze mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt (vgl. Abschnitt 5.3.4.3, Seite 125), um DNA-Reste sowie Enzyme aus der Lösung zu entfernen. Anschließend wurden die resultierenden DNA-Konzentrationen bestimmt. Die Ligation der jeweiligen Inserts mit dem geschnittenen pET-20b(+) Vektor erfolgte im Verhältnis 2:1 mit T4 DNA-Ligase.

3.1.4 Kontrollverdau und Sequenzierung der SecB-tragenden pET-20b(+) Vektoren

Nach Inaktivierung der Ligase durch Inkubation bei 65 °C wurde der Ligationsansatz entsprechend Abschnitt 5.3.4.7 in ultra-kompetente XL1-Blue Zellen transformiert. Die Wahl des Bakterienstamms, der zur Vermehrung der Plasmid-DNA eingesetzt wird, hat entscheidenden Einfluss auf die Qualität der isolierten DNA. Der *E. coli*-Stamm XL1-Blue ist besonders zur DNA-Vervielfältigung zwecks anschließender Sequenzierung geeignet, da er niedrige Rekombinationsraten und Endonukleaseaktivität aufweist, was zur verbesserten Stabilität der Inserts und zur Erzeugung qualitativ sehr hochwertiger DNA führt. Aus den entstandenen Transformanten wurden Minipräparationen der Plasmid-DNA und im Anschluss daran eine Charakterisierung durch Restriktionsverdau vorgenommen. Dazu wurden die kompletten pET-20b(+) Vektoren, einschließlich der einligierten His₆^T-SecB₁₋₁₅₅-Gene, mit den Enzymen NdeI und XhoI verdaut.

In Abb. 3.1.4 ist das Ergebnis des Doppelverdaus auf einem 1,2%igen Agarosegel abgebildet. Die berechneten Größen der durch den Doppelverdau entstandenen Fragmente betragen 3 588 bp für den geöffneten Vektor und 494 bp für das NdeI/XhoI geschnittene SecB-Insert. In jeder der Bahnen 1 - 3 war im unteren Teil des Gels die Bande des Inserts bei etwa 500 bp erkennbar. Im oberen Teil des Gels traten jedoch Doppelbanden bei ca. 3 500 bp und 4 000 bp auf. Diese lassen sich auf einen unvollständigen Verdau zurückführen. Vermutlich wurde der Vektor hier nur an einer Stelle durch eine der beiden Restriktionsendonukleasen geöffnet, was zu einer Bande bei 4 082 bp für den linearisierten Vektor führt, wodurch

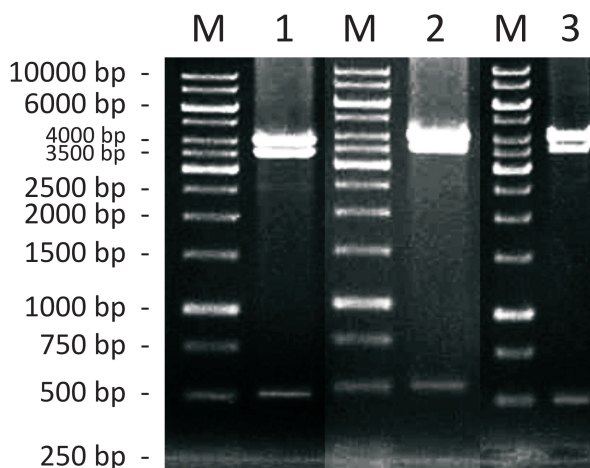


Abb. 3.1.4: 1,2%iges Agarosegel des Kontrollverdaus der pET-20b(+) SecB Vektoren mit NdeI und XhoI. Bahn M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; Bahn 1: pET-20b(+) SecB WT; Bahn 2: pET-20b(+) SecB E90C,C97,102A; Bahn 3: pET-20b(+) SecB Q14C.

sich die Bande bei 4 000 bp erklären lässt. Die durch beide Enzyme geschnittenen Vektoren sind in ihrer Größe um den Anteil des SecB-Inserts von 494 bp reduziert, was der jeweils unteren Bande der Doppelbanden bei ca. 3 500 bp entspricht. Die Übereinstimmung der Fragmentgrößen der auftretenden Banden mit den zuvor berechneten Größen weist auf eine erfolgreiche Modifizierung und Umklonierung der SecB-Gene hin.

Zur sicheren Verifizierung dieser Ergebnisse wurde außerdem eine Sequenzierung aller His₆^T-SecB₁₋₁₅₅-tragenden pET-20b(+) Vektoren mit den T7 *forward*- und *reverse*-Primern durchgeführt. Diese Primer wiesen, im Unterschied zu den zuvor eingesetzten SecB *forward*- und *reverse*-Primern, keine zu den SecB-Genen komplementären Sequenzen auf, sondern lagerten sich an auf dem Vektor liegenden Sequenzen vor und hinter den SecB-Genen an. Auf diesem Weg konnte somit auch die korrekte Lage der jeweiligen Gene im Vektor überprüft werden. Sämtliche Sequenzierungen lieferten fehlerfreie positive Ergebnisse für His₆^T-SecB₁₋₁₅₅-Sequenzen mit C-terminalem 6x His-Tag und der Thrombinschnittstelle. Sie sind in den Abb. A.2.1, A.2.3 und A.2.4 im Anhang dieser Arbeit dargestellt. Zusätzlich sind in den Sequenzierdaten alle für diese Arbeit relevanten Mutationsorte und Abweichungen zur SecB WT-Sequenz durch Umrahmung hervorgehoben. Die neu generierten His₆^T-SecB₁₋₁₅₅-tragenden Vektoren, die schematisch in Abb. A.1.2 im Anhang dargestellt sind, waren somit eindeutig charakterisiert und konnten für die weiteren Arbeiten verwendet werden.

3.1.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Der SecB-Wildtyp (WT) weist in seiner natürlichen Form vier Cystein-Reste an den Positionen 76, 97, 102 und 113 auf (PDB Code: 1QYN, RCSB PDB) (Dekker *et al.*, 2003). Von diesen reagieren die Reste an den Positionen 97 und 102 wesentlich schneller mit Spinlabel-Reagenzien als die der Reste 76 und 113 (Panse *et al.*, 2001). Im Folgenden ist ein vereinfachtes, quantitatives Labeling von SecB an einem definierten Cystein-Rest an jeder der vier monomeren Untereinheiten angestrebt. Zu diesem Zweck sollte, neben der vorhandenen Mutante SecB E90C, eine neue Mutante, SecB C76,102,113A - kurz SecB C97 - erzeugt werden.

Hierbei handelt es sich um eine Variante des Chaperons, die nur noch ein einziges Cystein in jeder Untereinheit an der reaktiven und gut zugänglichen Position 97 enthält. Die im natürlichen SecB vorkommenden Cysteine C76, C102 und C113 sollen gegen Alanine ausgetauscht werden. Somit sind spätere Abstandsmessungen und Untersuchungen zur Abstandsänderung bei Substratbindung zwischen definierten, identischen Positionen der jeweiligen monomeren Untereinheiten der beiden SecB-Mutanten durch Spinlabeling möglich.

Mit Hilfe der in Abschnitt 5.1.9 auf Seite 116 aufgezeigten Oligonukleotidprimer SecB_C76A *for* und *rev*, SecB_C102A *for* und *rev* und SecB_C113A *for* und *rev*, die jeweils mittig die nötigen Punktmutationen enthalten, wurden sukzessive die in Tab. 3.1.1 dargestellten Basenaustausche an

den Positionen 76, 102 und 113 durchgeführt, um die in der Sequenz enthaltenen Cysteine gegen Alanine zu ersetzen. Beim Design der Primer wurde darauf geachtet, dass diese zwischen 25 und 45 Basen lang waren und eine Schmelztemperatur zwischen 55 - 56 °C aufwiesen. Zu niedrige Schmelztemperaturen könnten eine unspezifische Bindung der Primer an die komplementären Sequenzen bedingen, was in unspezifischen Produkten, sog. Geisterbanden, resultieren kann. Zu hohe Temperaturen führen indes zu ineffizienter Produktbildung.

Tab. 3.1.1: Eingeführte Punktmutationen zur Erzeugung der Mutante SecB C97. Dargestellt sind die in der Wildtyp-Sequenz für Cystein codierenden Basentriplets und die mutierten Codons, die für Alanin codieren.

Position	ursprüngliches Codon	translatierte Aminosäure		mutiertes Codon	translatierte Aminosäure
76	tgt	Cystein	⇒	gct	Alanin
102	tgc	Cystein	⇒	gcc	Alanin
113	tgc	Cystein	⇒	gcc	Alanin

Die Durchführung der ortsgerichteten Mutagenese erfolgte basierend auf der SecB-Wildtyp-Sequenz, die im pET-20b(+) Vektor vorlag (vgl. Abschnitt 3.1.4), wie unter 5.3.3 auf Seite 124 beschrieben mit Hilfe des QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kits und ist schematisch in Abb. 3.1.5 auf Seite 36 dargestellt.

Hierzu wurde in einem ersten Schritt das betreffende Gen mit der zu mutierenden Zielsequenz (rote Kreuze) im entsprechenden Vektor isoliert (1). In der anschließend durchgeführten PCR (2) (vgl. Abschnitt 5.3.1, Seite 122) erfolgte die Denaturierung der Plasmide sowie das Annealing der jeweiligen *forward* bzw. *reverse* Oligonukleotidprimer-Paare (3), welche die gewünschte Mutation (grüne Kreise) tragen (2 - 4). Der Übersichtlichkeit halber sind beide Stränge getrennt dargestellt. Die PfuTurbo® DNA Polymerase verlängert die DNA-Stränge unter Einbeziehung der Mutagenese-Primer. Es resultieren mutierte, jedoch offene DNA-Stränge (5). Im Folgenden wurde die parentale, *dam*-methylierte Template-DNA, die kein Träger der entsprechenden Mutation ist, mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut (Abschnitt 5.3.3, Seite 124), um den selektiven Erhalt der mutierten DNA zu gewährleisten (6). Dieses Enzym erkennt das Sequenzmotiv GATC, jedoch schneidet es nur, wenn Adenin innerhalb dieser Sequenz durch die *dam*-Methylase methyliert wurde. Durch die anschließende Transformation der doppelsträngigen, jedoch eingeschnittenen DNA in ultra-kompetente XL1-Blue Zellen wurden die Einschnitte im mutierten Plasmid von den Zellen repariert und das Plasmid vermehrt (7).

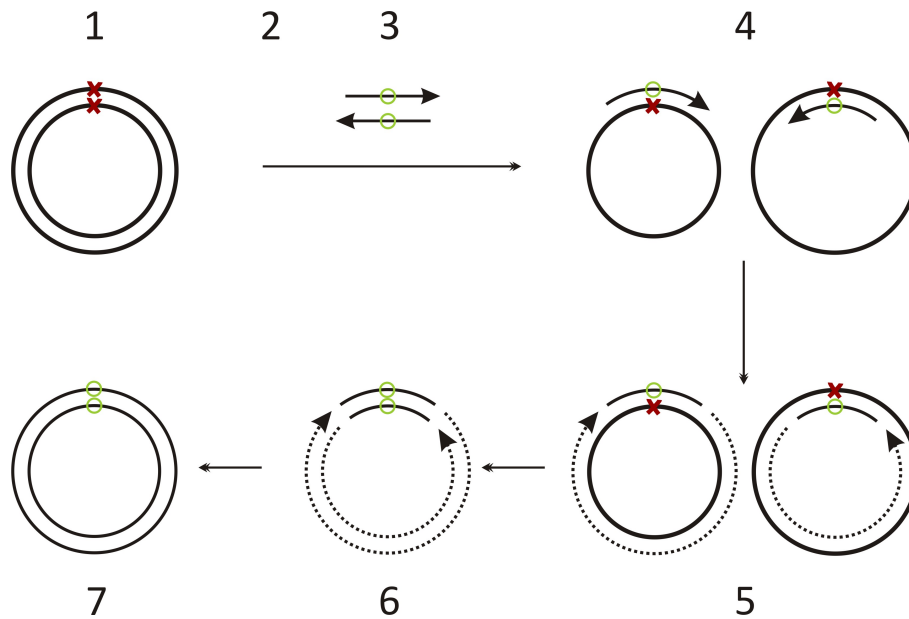


Abb. 3.1.5: Schematische Darstellung zur ortsgerechten Mutagenese. 1: Isolierung der Plasmide; 2: PCR mit entsprechenden Mutagenese-Primern; 3: Mutagenese-Primer; 4: Denaturierung der Plasmide und Annealing; 5: Strangverlängerung; 6: Verdau der parentalen DNA mit DpnI; 7: Transformation in ultra-kompetente Zellen.

Das so vermehrte, mutierte Plasmid wurde isoliert und diente als Ausgangspunkt für die beiden nachfolgenden Mutagenesezyklen mit den übrigen *SecB forward* bzw. *reverse* Oligonukleotidprimer-Paaren. Zur Verifizierung der einzelnen Mutationsschritte wurde nach jeder Stufe eine Sequenzanalyse des entsprechenden DNA-Abschnitts durchgeführt, bevor die nächste Punktmutation eingefügt wurde.

Das finale Sequenzierergebnis, nach drei aufeinander folgenden Mutagenesestufen, ist in Abb. A.2.2, Seite 159 dokumentiert. Der Sequenzvergleich mit dem *SecB* WT-Genom in Abb. 3.1.6, Seite 37 zeigt orange unterlegt, dass alle durchgeführten Mutationen erfolgreich in das *SecB*-Genom integriert wurden. Des Weiteren sind keinerlei ungewünschte Veränderungen, die von der Wildtyp-Sequenz abweichen, eingeführt worden und alle nötigen Charakteristika der Sequenz, ebenfalls in Abb. 3.1.6 hervorgehoben, vorhanden.

			Start SecB	
SecB WT	1	acata	atgtcagaacaaaacaacactgaaatgactttccagatccaacgtatttatac	aa
SecB C97	1
SecB WT	61	ggata	tctctttcgaagcgccgaacgcgcgcacgttttccagaaagattggcaaccaga	
SecB C97	61
SecB WT	121	agttaa	acttgatctggatacggcatcttcccaactggcagatgacgtatacgaagtgg	
SecB C97	121
SecB WT	181	actg	cggtgttacccgtaacggcctctttgggcgaagaaaccgcgttctctg	tgc
SecB C97	181	gc.
SecB WT	241	gcag	ggcggtatTTTTctccatcgcggtatcgaaggcaccagatggcgcattgcctggg	
SecB C97	241
SecB WT	301	agcata	ctgc	ccgaacattctgttcccgatgctcgtgag
SecB C97	301	gc.
SecB WT	361	ccgc	ggtacattcccgcaactgaaccttgccgggttaacttcgatg	gcctgttcatgaa
SecB C97	361
SecB WT	421	ctatt	tgagcagcaggctggcgaaggtactgaagaacatcaggatgccagcagggc	ct
SecB C97	421
SecB WT	481	ggtg	ccg	cgccgagcaccaccaccaccactgag
SecB C97	481
		Thrombinschnittstelle	6x His-Tag	

Abb. 3.1.6: Sequenzvergleich der neu generierten Mutante SecB C97 mit der SecB WT-Sequenz. Die eingefügten Mutationen sowie wichtige Charakteristika sind hervorgehoben.

Die neue Mutante His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ C97 wurde somit eindeutig charakterisiert und konnte zur Proteingewinnung verwendet werden.

3.2 Proteinisolierung von SecB

Vor der Proteinexpression wurden die für die entsprechenden SecB-Mutanten His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ C97 und His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ E90C codierenden pET-20b(+) Vektoren aus den *E. coli* XL1-Blue Zellen, welche aufgrund ihrer hohen Transformationsrate ($\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μ g pUC18 DNA) und niedrigen Nukleaseaktivität als Klonierungsstamm gewählt wurden, isoliert und in *E. coli* KRX-Zellen transformiert (vgl. Abschnitt 5.3.4.7 und 5.3.4.8). Dieser Bakterienstamm ist besonders gut für die Proteinexpression geeignet, da die Proteolyse überexprimierter Proteine unter anderem durch die Mutationen $\Delta ompP$ und $\Delta ompT$ minimiert wird, was zur Erhöhung der Proteinausbeute führt. Des Weiteren wird die Genexpression durch eine Kopie des T7 RNA-Polymerase-Gens und des Rhamnose-Promotors reguliert ($\Delta(rhaBAD)::T7$ RNA Polymerase). Der Rhamnose-Promotor unterliegt der katabolischen Repression durch Glukose und kann durch Zugabe von Rhamnose, welche selber aufgrund Deletion der entsprechenden Enzymgene nicht metabolisiert werden kann, kontrolliert aktiviert werden. So wird das Zielprotein mit konstanter Rate exprimiert (Hartnett *et al.*, 2006; Litterer und Schagat, 2007; Schagat *et al.*, 2008).

Von den neuen Transformanten wurden Glycerinkulturen angelegt (Abschnitt 5.4.3, Seite 129) und der Erfolg der Transformationen durch Kontrollausstriche auf ampicillinhaltigen Agarplatten verifiziert.

Im Folgenden wird die Proteingewinnung aller SecB-Mutanten exemplarisch an der neu generierten Mutante His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ C97 dargestellt.

3.2.1 Expression und Lyse

Von einer KRX-Glycerinkultur, die den für die jeweilige SecB-Mutante codierenden pET-20b(+) Vektor trug, wurden zu Beginn der Expression Verdünnungsausstriche auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten angelegt und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden 2xYT-Übernachtmedien mit je einer isolierten Kolonie angeimpft und diese Kulturen bei 37 °C, 275 rpm inkubiert. Anschließend wurden *large-scale* Kulturen mit je 7,5 ml dieser Übernachtskulturen inokuliert und bei 37 °C, 275 rpm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,4 - 0,5 inkubiert (vgl. Abschnitt 5.2.1.1, Seite 119). Für die weitere Inkubation wurde die Temperatur, in Abb. 3.2.1, Seite 39 blau gekennzeichnet, bei ansonsten gleich bleibenden Bedingungen auf 15 - 20 °C reduziert. Die Rhamnose-regulierte Induktion der Proteinexpression erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 (rote Markierung). Die Inkubation wurde über Nacht bis zum Eintritt in die stationäre Phase, die in allen Fällen bei einer OD₆₀₀ von etwa 2,5 lag, fortgesetzt. Abb. 3.2.1 stellt die zeitliche Kontrolle des Bakterienwachstums durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm dar. Die Wachstumskurve wurde logistisch gefittet und alle Charakteristika, wie Lag-Phase, Log-Phase und stationäre Phase fanden sich deutlich wieder.

Anschließend wurde das Zellwachstum durch Inkubation auf Eis gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation bei 4 420x g geerntet (vgl. Abschnitt 5.4.4.1, Seite 129).

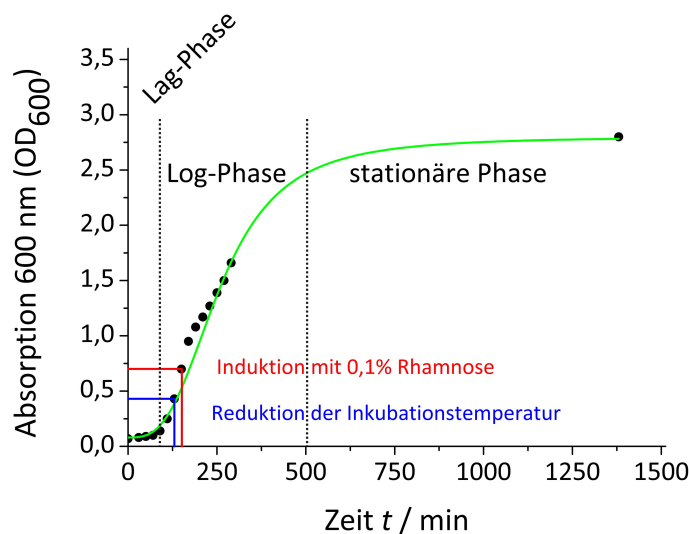


Abb. 3.2.1: Bakterienwachstum der *large-scale* Kultur von His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ C97. Die Wachstumskurve wurde logistisch gefittet und die charakteristischen Phasen des Wachstums markiert. Hervorgehoben sind der Zeitpunkt der Temperaturregulierung und der Induktion.

Um die Expression von SecB zu überprüfen, wurde der komplette Proteinhaushalt der Bakterien mittels SDS-PAGE vor und nach der Induktion mit Rhamnose untersucht (siehe Abb. 3.2.2, Seite 40). Dazu wurden 1 ml der *large-scale* Kultur vor Induktion und 0,5 ml Kultur nach Beendigung des Zellwachstums abzentrifugiert und die in 50 µl 4x SDS-Probenpuffer und 50 µl H₂O_{dd} denaturierten Pellets auf ein SDS-Gel aufgetragen. Im Vergleich zu Bahn 1, die die *E. coli*-Proteine vor der Induktion bei einer OD₆₀₀ von 0,6 zeigt, war nach Induktion der *large-scale* Kultur in Bahn 2 deutlich das verstärkte Auftreten einer Bande bei einer Größe von knapp unter 20 kDa zu beobachten. Dies entspricht der Größe einer monomeren Untereinheit des 68,8 kDa schweren SecB-Tetramers von 17,2 kDa (Murén *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Dekker *et al.*, 2003) und zeigt somit klar die Überexpression des Zielproteins. Bedingt durch die denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE wurden hier nur SecB-Monomere und teilweise unvollständig denaturierte Dimere detektiert. Bei der Molekulargewichtsbestimmung war jedoch zu beachten, dass das vorliegende SecB-Protein noch die zusätzlichen Aminosäuren des 6x His-Tags sowie der Thrombinschnittstelle enthielt, was somit bei Auswertung der SDS-PAGE, abweichend vom Literaturwert, zu einer erhöhten Größe des His₆^T-SecB₁₋₁₅₅-Monomers führte (vgl. hierzu Abschnitt 3.2.3, Seite 42 und Abb. 3.2.4 auf Seite 44). Die Analyse dieser Gelbande im Densitometer wies einen Proteingehalt von 17,2% des gesuchten Zielproteins bei entsprechender Molekularmasse auf.

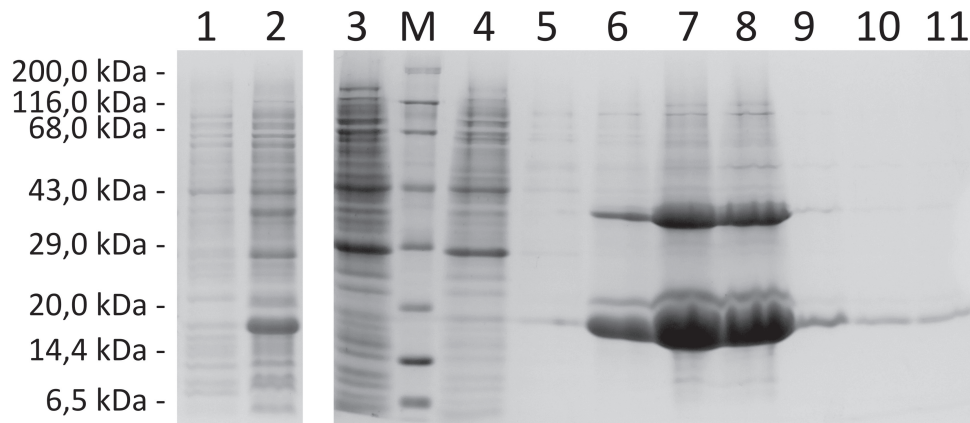


Abb. 3.2.2: 15%ige SDS-PAGE der Induktion und Nickel-Affinitätschromatographie von His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ C97. Bahn 1: *large-scale* Kultur His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ C97 vor Induktion bei einer OD₆₀₀ von 0,6 (Zellpellet aus 1 ml Kultur); Bahn 2: *large-scale* Kultur His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ C97 nach Induktion mit 0,1% Endkonzentration Rhamnose (Zellpellet aus 0,5 ml Kultur); Bahn M: Protein Marker III; Bahn 3: Durchlauf der Ni-NTA-Agarose Säule (5 µl); Bahnen 4, 5: Waschfraktionen 20 mM Imidazol (10 µl); Bahnen 6 - 11: Elutionsfraktionen 500 mM Imidazol (10 µl; Bahn 7: 5 µl). Das aufgereinigte Protein ist als Monomer und zum Teil als unvollständig denaturiertes Dimer detektierbar.

Nach Waschen des Zellpellets zur Entfernung von Nährmediumrückständen, erneutem Zentrifugieren und Aufnahme in Resuspendierungspuffer wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. Abschnitt 5.4.4.1, Seite 129). Daraufhin erfolgte die Abtrennung der löslichen Zellproteine von Zelltrümmern und *inclusion bodies* der lysierten Zellen durch Zentrifugation bei 18 900x g. Umgerechnet ergaben sich durchschnittlich 44% an unlöslichem Zellmaterial aus dem Pellet von drei Litern geernteter Bakterienkultur. Der lösliche Überstand wurde durch Ultrazentrifugation bei 184 000x g von verbliebenen Schwebstoffen, welche die spätere Isolierung von His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ stören können, gereinigt. Die Gesamtproteinmenge des aufgereinigten Lysats wurde mittels BCA-Test (vgl. Abschnitt 5.2.1.2, Seite 119) bestimmt. Es ergab sich eine Proteinmenge von etwa 1,1 g aus drei Litern Zellkultur. Das klare Lysat konnte ohne weitere Aufarbeitung direkt für die Nickel-Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

3.2.2 Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Bei der von Panse (Panse *et al.*, 1998) beschriebenen Art der Isolierung von SecB (vgl. Abschnitt 3.1, Seite 30) erfolgte die Aufreinigung des Zelllysats durch zwei aufeinanderfolgende säulenchromatographische Schritte, einem Anionenaustausch sowie einer anschließenden Gelfiltration nach dem Größenausschlussprinzip. Diese Art der Aufreinigung ist mit hohem Zeitaufwand und dem Einsatz großer Puffervolumina verbunden. Durch die bereits im vorangegangenen Kapitel beschriebenen gentechnischen Veränderungen durch die Einführung eines 6x His-Tags konnte die Aufreinigung der His₆^T-SecB₁₋₁₅₅-Mutanten in vorliegender Arbeit in einem einzigen Säulenschritt mittels Nickel-Affinitätschromatographie unter nativen

Bedingungen erfolgen. Hierbei handelt es sich um eine Art der *Immobilized-Metal Affinity Chromatography*, IMAC. Nitrilotriessigsäure (NTA), welche am Trägermaterial Sepharose CL-6B immobilisiert war, diente als besonders stabiler vier-zähliger Chelatbildner für Nickel-Ionen (siehe Abb. 3.2.3(C)) (QIAGEN, 2003). Somit standen zwei der sechs Ligandenbindungsstellen der Nickelion-Koordinationssphäre zur Wechselwirkung mit dem C-terminalen 6x His-Tag der SecB-Mutanten zur Verfügung, was die gezielte Isolierung aus dem Zellysate in hoher Reinheit ermöglichte.

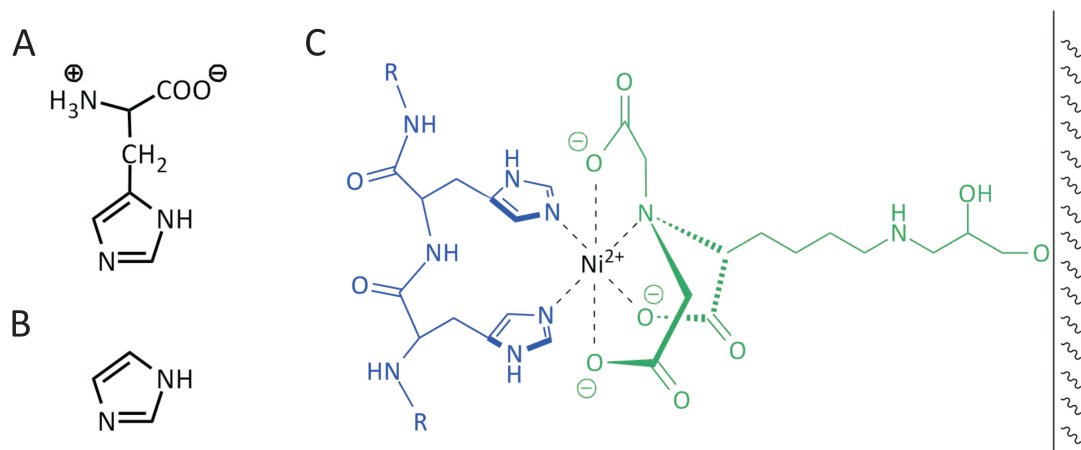


Abb. 3.2.3: (A) Strukturformel der Aminosäure Histidin. (B) Strukturformel von Imidazol. (C) Schematische Darstellung der Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Ni^{2+} -Ionen werden von am Säulenmaterial immobilisierter Nitrilotriessigsäure (NTA) (grün) chelatisiert und wechselwirken mit benachbarten Resten des 6x His-Tags des Zielproteins (blau). In Anlehnung an (QIAGEN, 2003).

Zur Aufreinigung der Proteine wurde das Zellysate, welches die spätere mobile Phase darstellt, direkt mit dem Nickel-NTA-Agarose Säulenmaterial unter leichtem Schütteln inkubiert, so dass die Imidazolgruppen der Polyhistidinsequenz mit hoher Affinität und Selektivität von den zweiwertigen Nickel-Kationen der späteren stationären Phase komplexiert werden konnten. Anschließend wurde die Affinitätssäule mit dem nun beladenen Säulenmaterial, wie in Abschnitt 5.4.4.2, Seite 130 beschrieben, gegossen. Alle säulenchromatographischen Fraktionen, wie Durchlauf, Wasch- und Elutionsfraktionen, wurden zur Analyse und Identifizierung mittels SDS-PAGE aufgefangen. Das Elutionsprofil der Nickel-Affinitätschromatographie ist exemplarisch für $\text{His}_6^T\text{-SecB}_{1-155}$ C97 in Abb. 3.2.2 in den Bahnen 3 - 11 dargestellt. Bahn 3 zeigt den Durchlauf der nicht gebundenen Proteine des Lysates. Im Vergleich zu Bahn 2, welche eine deutliche Bande überexprimierten $\text{His}_6^T\text{-SecB}_{1-155}$ nach der Induktion aufweist (vgl. Abschnitt 3.2.1), ist an entsprechender Stelle in Bahn 3 keine Proteinhäufung mehr erkennbar. Somit hatten die Chaperone mit dem 6x His-Tag an die Nickel-Ionen des Säulenmaterials gebunden.

Da bei der Aufreinigung unter nativen Bedingungen die Tendenz besteht, mit geringer Affinität „Verunreinigungen“ zu binden, die beispielsweise durch Proteine mit gut exponierten Histidin-Resten verursacht werden können, mussten diese unspezifisch gebundenen Proteine

durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer von der Säule entfernt werden. Dieser Puffer enthielt eine Konzentration von 20 mM Imidazol. Imidazol selbst ist ebenfalls in der Lage, an Nickel-Ionen zu binden. Aufgrund der durch die Imidazoleinheit bedingten strukturellen Ähnlichkeit zu Histidin (siehe Abb. 3.2.3(A) und (B), Seite 41) und der höheren Bindungsaffinität zu den Nickel-Ionen konkurriert Imidazol mit den Histidin-Resten um die Bindungsplätze und verdrängt die Histidin-Reste. In der niedrigen Konzentration von 20 mM wurden jedoch lediglich die leichter dissoziierbaren Wechselwirkungen der nicht markierten, unspezifisch gebundenen Proteine gestört, so dass diese von der Säule eluierten, während die 6x His-Tags der Chaperone weiterhin stark an die Nickel-NTA-Matrix gebunden blieben. Dieses Resultat spiegelt sich deutlich in den Gel-Bahnen 4 und 5 wider. Bereits im ersten Waschschrift in Bahn 4 war der Großteil der unspezifisch gebundenen Proteine von der Säule abgetrennt, wohingegen der zweite Waschschrift nahezu keinerlei Verunreinigungen enthielt. Jedoch ließ sich hier bereits eine leichte Bande von SecB erkennen, allerdings in so geringem Maß, dass auf diesen Waschschrift zugunsten einer späteren erhöhten Reinheit des Proteins nicht verzichtet wurde.

Die Elution von His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ erfolgte mit Elutionspuffer, der eine Imidazol-Konzentration von 500 mM enthielt. Die Untersuchung der resultierenden Fraktionen sind in den Gel-Bahnen 6 - 11 abgebildet. Bereits im zweiten Elutionsschritt war die Entfärbung des im proteinbeladenen Zustand gelblich gefärbten Säulenmaterials zu seiner ursprünglichen blauen Farbe zu beobachten. Dies zeigte, dass bei diesen hohen Imidazol-Konzentrationen die 6x His-Tags der His₆^T-SecB₁₋₁₅₅-Proteine nun nicht mehr um die Bindungsstellen des Säulenmaterials kompetieren konnten und ebenfalls dissoziierten. Aufgrund der denaturierenden Bedingungen im SDS-Gel konnten, neben einigen unvollständig denaturierten Dimeren bei etwa 35 kDa, die monomeren Untereinheiten des SecB in hoher Konzentration im Bereich unterhalb von 20 kDa detektiert werden.

Die Untersuchung im Densitometer ergab eine Reinheit von 66% für die Monomer-Banden von His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ C97 und 29,5% für den unvollständig denaturierten dimeren Anteil. Somit gelang es, das Chaperon in 95,5%iger Reinheit zu isolieren.

Um Imidazol, welches die spätere Thrombinspaltung stören würde, aus der Reaktionsmischung zu entfernen, wurden die His₆^T-SecB₁₋₁₅₅-haltigen Fraktionen zweimal gegen jeweils 5 l Dialysepuffer dialysiert und steril filtriert (siehe Abschnitt 5.4.4.2, Seite 130). Aus der Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Test ergab sich, dass rund 383 mg His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ aus drei Litern Kulturmedium mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnten.

3.2.3 Thrombinspaltung

Das wie vorangehend beschrieben aufgearbeitete His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ wurde nun einer Thrombinspaltung unterzogen. Bei dieser sollte der carboxyterminale 6x His-Tag, der immer noch via Thrombinschnittstelle mit dem SecB-Protein fusioniert war, mit der Endoprotease Thrombin,

einem 36 kDa großen Enzym, welches an der Signalsequenz LeuValProArg↓GlySer zwischen dem SecB-Protein und dem 6x His-Tag die Peptidbindung N-terminal des Glycin-Rests spaltet, abgetrennt werden und SecB₁₋₁₅₅ entstehen.

Für die Reaktion wurde das His₆^T-SecB₁₋₁₅₅-haltige Dialysat direkt mit der entsprechenden Menge Thrombin versetzt (1 U Thrombin (1,44 U/μl) pro 1 mg SecB) und 16 h bei Raumtemperatur inkubiert (vgl. Abschnitt 5.4.4.4, Seite 131). Um daraufhin den abgespaltenen 6x His-Tag und das Thrombin aus dem Spaltansatz zu entfernen, wurde dieser fünfmal mit wenigen Millilitern Phenylmethansulfonylfluorid(PMSF)-haltigem Dialysepuffer in einem 50 kDa Konzentrator aufgereinigt. Bei der Zentrifugation wurden sowohl das 36 kDa große Thrombin als auch der abgespaltene 6x His-Tag, welche beide kleiner als der Porendurchmesser der Filtrationsmembran sind, mit dem Filtrat ausgewaschen. Das vom 6x His-Tag befreite 68,8 kDa große SecB₁₋₁₅₅-Tetramer konnte nicht durch die Membranporen treten und wurde somit im Überstand zurückgehalten und aufkonzentriert. Dabei war zu beachten, dass SecB nicht soweit konzentriert wird, dass es als unlösliches Aggregat aus der Lösung ausfällt. Die finale Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Test bestimmt. Es ergab sich, dass aus insgesamt drei Litern der *E. coli*-Zellkultur ca. 333 mg, also 111 mg pro Liter, SecB₁₋₁₅₅ isoliert werden konnten. Der durch Abspaltung des 6x His-Tags theoretisch bestimmte Proteinverlust bei ansonsten quantitativer Proteinaufreinigung beträgt 9,1%. Experimentell wurde ein Verlust von 13% verzeichnet. Das stellt einen Ausbeuteverlust von rund 3,9% bei der Aufreinigung der Thrombinspaltung dar, der in Kauf genommen wurde, da so große Volumina an Protein in vergleichsweise kurzer Zeit und exzellenter Reinheit gewonnen werden konnten.

Der Vergleich der Proteinbanden vor und nach der Thrombinspaltung mittels SDS-PAGE (Abb. 3.2.4(A), Seite 44) zeigte einen deutlichen molaren Massenverlust von SecB₁₋₁₅₅ in Bahn 2 im Vergleich zu Bahn 1, in der His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ aufgetragen war. Dies bestätigte die erfolgreiche Abspaltung und Entfernung des 6x His-Tags. Mit Hilfe der in Abb. 3.2.4(B) aufgestellten Regressionsgeraden wurde die Größe von His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ vor der Thrombinspaltung zu 18,6 kDa berechnet. Nach der Spaltung betrug die Größe von SecB₁₋₁₅₅ 17,1 kDa. Dies deckt sich mit dem Literaturwert von 17,2 kDa für eine monomere SecB-Untereinheit (Murén *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Dekker *et al.*, 2003). Der Massenverlust von 1,5 kDa durch die Thrombinspaltung korrespondiert hierbei mit den in der Literatur gefundenen Werten für die Abspaltung eines 6x His-Tags (Hossann, 2004).

Die Reinheit der vollständig isolierten und aufgereinigten SecB₁₋₁₅₅-Bande wurde mit Hilfe des Densitometers zu annähernd 100% bestimmt.

Der somit isolierte und aufgearbeitete Anteil des reinen Proteins SecB₁₋₁₅₅ im Vergleich zur Gesamtmasse aller *E. coli*-Proteine im Roh-Zellysate betrug ca. 31%.

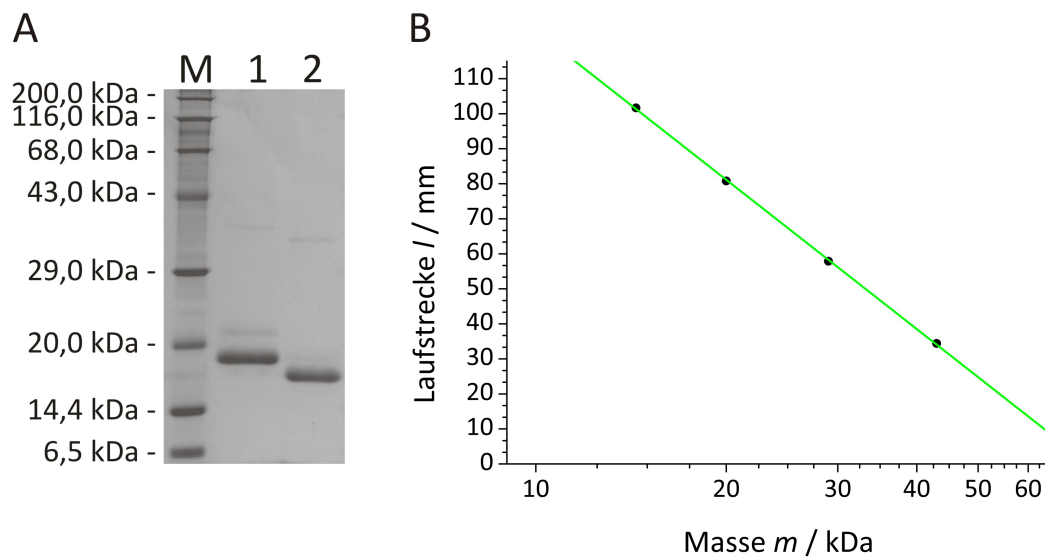


Abb. 3.2.4: (A) 15%ige SDS-PAGE der Thrombinspaltung von SecB C97. Bahn M: Protein Marker III; Bahn 1: SecB C97 (4 μ g) mit 6x His-Tag vor Thrombinspaltung; Bahn 2: SecB C97 (4 μ g) ohne 6x His-Tag nach Thrombinspaltung. (B) Regressionsgerade der Markerproteine zur Bestimmung des Molekulargewichts von SecB. Die Laufstrecke der Banden im SDS-Gel wurde gegen das logarithmierte Molekulargewicht aufgetragen.

3.2.4 Immunologische Charakterisierung

Zum Nachweis und zur Detektion der 6x His-Tag-fusionierten SecB-Proteine wurde ein immunologischer Nachweis mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) unter Verwendung von Anti-His₆-Antikörpern (vgl. Abschnitt 5.5.1, Seite 133) durchgeführt. Somit war es möglich, die erfolgreiche Abspaltung des 6x His-Tags nach der Thrombinspaltung zusätzlich zur SDS-PAGE Analyse (vgl. Abb. 3.2.4(A)) mittels ELISA zu verifizieren (Abb. 3.2.5, Seite 45). Hierbei wurden Proben der isolierten SecB-Mutanten SecB₁₋₁₅₅ E90C und SecB₁₋₁₅₅ C97 mit einer Konzentration von 20 μ g/ml vor und nach der Thrombinspaltung getestet. Zur Untersuchung wurde ein monoklonaler Maus-Anti-His₆-Antikörper (Verdünnung 1:3 000) und zur Detektion dieses primären Maus-Antikörpers ein sekundärer, F_{ab} spezifischer Ziegen-Anti-Maus IgG-Antikörper (Verdünnung 1:1 000) eingesetzt und die Absorptionsänderung über die Zeit detektiert. Eine Probe wurde als positiv, d. h. nicht thrombingespaltend bewertet, wenn der Mittelwert der jeweiligen Probe größer als die Summe aus dem Mittelwert der Negativkontrolle und der zweifachen Standardabweichung war.

Die Resultate sind in Abb. 3.2.5 dargestellt. Aufgetragen wurden die beiden SecB-Mutanten mit 6x His-Tag und ohne 6x His-Tag jeweils vor und nach der Thrombinspaltung. In beiden Tests diente BSA (rot) als Negativkontrolle. Bei der Charakterisierung von SecB₁₋₁₅₅ E90C, Abb. 3.2.5(A), diente His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ als Positivkontrolle (grün). Neben His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ E90C (cyan-schraffiert) wurde SecB₁₋₁₅₅ E90C (blau) getestet. Bereits nach 10 min zeigte His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ E90C eine deutlich positive Reaktion, die sogar einen stärkeren Absorptions-

anstieg als die Positivkontrolle aufwies. Diese Entwicklung blieb auch bei den nachfolgenden Messzeiten bestehen und verstärkte sich sogar. Eine mögliche Begründung hierfür liegt in der Größe der getesteten Proteine. Das ca. 33 kDa große His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ besitzt annähernd die doppelte Masse einer 18,6 kDa großen monomeren His₆^T-SecB₁₋₁₅₅-Untereinheit. Daraus ergibt sich, dass das SecB-Tetramer vier 6x His-Tags bei einem Molekulargewicht von rund 75 kDa aufweist. Bei einer im ELISA eingesetzten Testkonzentration der Proteine von 20 µg/ml resultiert somit genähert eine doppelt so hohe 6x His-Tag-Konzentration für das Chaperon SecB im Vergleich zu Gelonin, was die erhöhte Signalintensität für His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ E90C erklärt. Die Absorption von thrombingespaltenem SecB₁₋₁₅₅ E90C lag zu allen Messzeiten deutlich unterhalb der Absorptionswerte der aufgetragenen 6x His-Tag-fusionierten Proteine und in vergleichbaren Dimensionen mit denen der Negativkontrolle BSA. In absoluter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der SDS-PAGE (für SecB₁₋₁₅₅ E90C nicht dargestellt) war die erfolgreiche Abspaltung des 6x His-Tags von SecB₁₋₁₅₅ E90C somit sicher nachgewiesen.

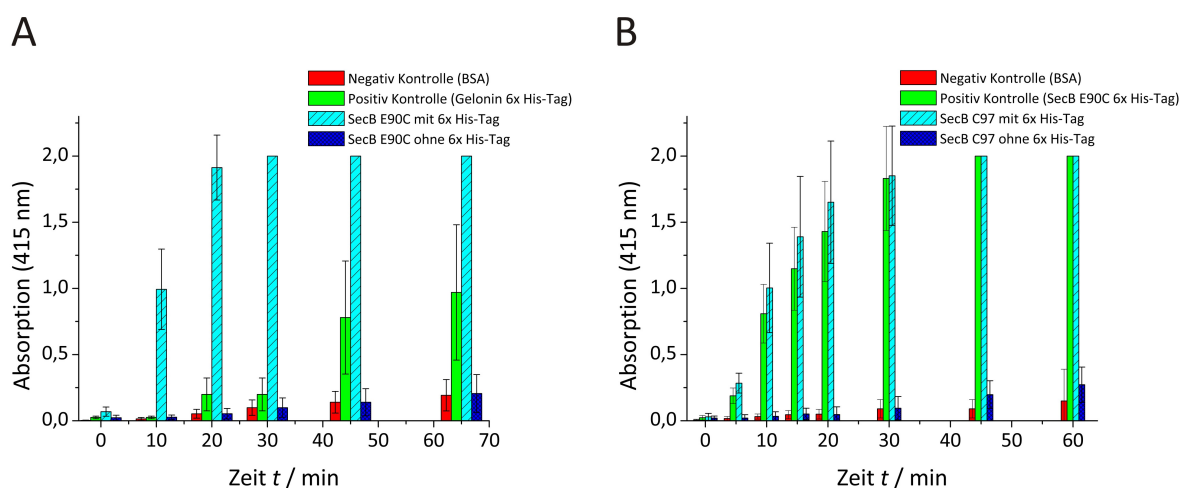


Abb. 3.2.5: ELISA mit monoklonalen Mausantikörpern Anti-His₆ (1:3 000) zur Verifizierung der erfolgreichen Abspaltung des 6x His-Tags nach Thrombinspaltung. **(A)** ELISA von SecB₁₋₁₅₅ E90C. Negativkontrolle (rot): BSA (16 µg); Positivkontrolle (grün): His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ (16 µg); 16 µg His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ E90C (cyan-schraffiert); 16 µg SecB₁₋₁₅₅ E90C (blau). **(B)** ELISA von SecB₁₋₁₅₅ C97. Negativkontrolle (rot): BSA (16 µg); Positivkontrolle (grün): His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ E90C (16 µg); 16 µg His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ C97 (cyan-schraffiert); 16 µg SecB₁₋₁₅₅ C97 (blau).

Da sich, wie bereits diskutiert, His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ E90C als deutlich effizientere Positivkontrolle im Vergleich zu His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ erwies, wurde His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ E90C zur Untersuchung von SecB₁₋₁₅₅ C97 als Positivkontrolle (grün) eingesetzt (Abb. 3.2.5(B)). His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ C97 ist cyan-schraffiert und SecB₁₋₁₅₅ C97 in blau dargestellt. Auch hier war der rasche und starke Absorptionsanstieg der Positivkontrolle sowie in vergleichbarem Maße die starke Reaktion von His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ C97 zu erkennen. Die Absorptionswerte des thrombingespaltenen SecB₁₋₁₅₅ C97 liegen hierbei in der Größenordnung der Negativkontrolle BSA. Übereinstimmend mit den Resultaten der SDS-PAGE (Abb. 3.2.4(A), Seite 44) konnte somit auch für die Mutante

SecB₁₋₁₅₅ C97 die erfolgreiche Entfernung des 6x His-Tags belegt werden.

Die vollständig charakterisierten SecB-Mutanten wurden nun in den weiteren Versuchen eingesetzt. Zur besseren Übersichtlichkeit werden die 6x His-Tag freien Proteine von nun an kurz als SecB E90C und SecB C97 bezeichnet.

3.3 Chemische Modifizierung von SecB

3.3.1 *Site-directed Spinlabeling* mit MTS

Zur Durchführung von Abstandsmessungen und späteren Untersuchungen von Konformationsänderung durch Substratbindung mussten EPR-aktive Zentren, sogenannte Spinlabel, an bekannten Positionen der Chaperone eingebaut werden. Dies wurde mit Hilfe des *Site-directed Spinlabeling* realisiert. Hierbei dienten Cystein-Reste den Spinlabeln als Ankerpunkte. Die Mutante SecB C97 enthält nur noch ein Cystein in jeder monomeren Untereinheit an der reaktiven und gut zugänglichen Position 97. Die drei weiteren im SecB-Wildtyp vorkommenden Cysteine an den Positionen 76, 102 und 113 wurden durch gezielte Punktmutationen gegen Alanine ausgetauscht (siehe Abschnitt 3.1.5, Seite 34). Im Fall der Mutante SecB E90C hingegen wurde die Glutaminsäure an Position 90 gegen Cystein ausgetauscht und die in der Wildtyp-Sequenz enthaltenen Cysteine an den Positionen 97 und 102 gegen Alanine. Bei Position 90 handelt es sich um einen besonders exponierten, leicht zugänglichen Rest an der Peripherie des Proteins (vgl. Abb. 3.7.1 rechts, Seite 84 und Abb. 3.8.6, Seite 93). Vorangegangene Untersuchungen von Krishnan (Krishnan *et al.*, 2009) hatten, wie bereits in Abschnitt 3.1, Seite 30 erwähnt, gezeigt, dass die Mutante SecB E90C an dieser Position einfach und selektiv mit diversen Fluoreszenzlabeln markiert werden kann. So konnte auch belegt werden, dass die Cysteine C76 und C113 im nativ gefalteten Protein nahezu nicht lösungsmittelzugänglich sind (Krishnan, 2004). Daher war auch diese SecB-Mutante besonders interessant für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Spinlabeling-Experimente, die es ermöglichen sollten, zwischen definierten identischen Positionen der jeweiligen monomeren Untereinheiten der beiden SecB-Mutanten Abstandsuntersuchungen durchzuführen.

Das verwendete Spinlabel 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- Δ^3 -pyrrolidin-3-methylthiosulfonat (MTS) ist ein luft- und temperaturbeständiges, sterisch gehindertes Nitroxid-Radikal. In einer S_N2 -Reaktion bindet es unter Ausbildung einer Disulfidbrücke kovalent an die Cystein-Seitenketten der Proteine (vgl. Abb. 3.3.1, Seite 48). Dabei weist MTS eine hohe Spezifität für Thiolgruppen auf. Aus den Spektren spinmarkierter Proben können nicht nur Informationen über den Abstand der Spinlabel voneinander, sondern auch über deren Mobilität und die Polarität der Umgebung gewonnen werden (Steinhoff *et al.*, 2000; Akdogan *et al.*, 2010).

Das Spinlabeling der SecB-Mutanten erfolgte, wie in Abschnitt 5.6.3, Seite 135 beschrieben, nach modifizierter Vorschrift von Crane (Crane *et al.*, 2005). Dabei wurde die Spinlabel-Verbindung im Überschuss zugesetzt, um eine möglichst quantitative Modifizierung der Chaperone zu gewährleisten. Zur Vermeidung weiterer unspezifischer Reaktionen wurde überschüssiges, nicht umgesetztes MTS säulenchromatographisch abgetrennt, bevor die modifizierten SecB-Mutanten in weiteren Experimenten eingesetzt wurden.

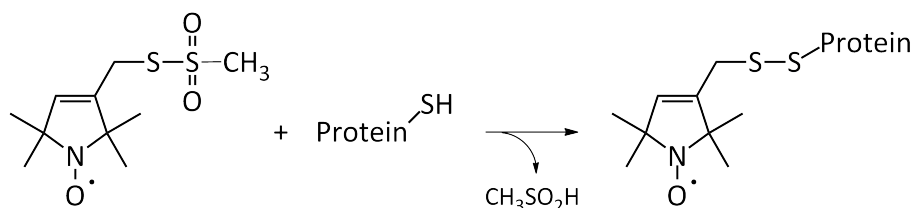


Abb. 3.3.1: Das Spinlabel MTS (1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- Δ^3 -pyrrolidin-3-methylthiosulfonat) reagiert in einer S_N2 -Reaktion unter Ausbildung einer kovalenten Bindung mit zugänglichen Cystein-Gruppen des Proteins. Dabei wird ein Äquivalent Methylsulfonsäure ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{H}$) freigesetzt. Der berechnete Massenshift Δm_{calc} beträgt 185,3 Da.

3.3.2 MALDI-ToF Massenspektrometrie von chemisch modifiziertem SecB

Zur Verifizierung des erfolgreichen Spinlabelings wurden die ungelabelten und MTS-modifizierten Mutanten SecB C97 sowie SecB E90C unverdaut mittels *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight* Massenspektrometrie (MALDI-ToF MS) analysiert (siehe Abschnitt 5.7, Seite 136). Das Ergebnis ist exemplarisch für SecB C97 in Abb. 3.3.2 dargestellt. Da die Chaperon-Tetramere durch die Energie des Laserbeschusses in ihre monomeren Untereinheiten zerfielen, korrespondierte der resultierende Massenpeak mit der Masse der SecB-Monomeren. Der experimentelle Massenunterschied von 185,2 Da zwischen ungelabeltem (blau) und MTS-gelabeltem Protein (grün) stimmte mit dem berechneten Shift von 185,3 Da sehr gut überein.

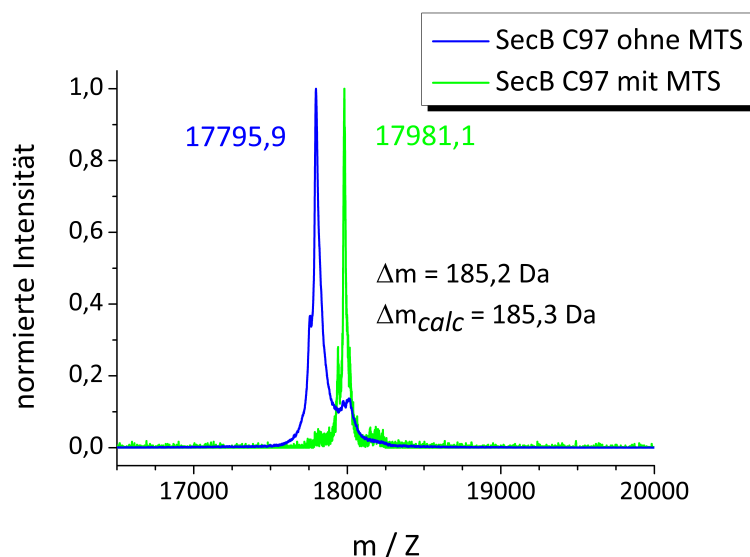


Abb. 3.3.2: Normierte MALDI-ToF MS von SecB C97. Der blaue Graph stellt die Massenanalyse von SecB C97 ohne MTS dar. Der grüne Graph repräsentiert MTS-gelabeltes SecB C97. Der experimentell ermittelte Massenzuwachs von $\Delta m = 185,2$ Da entspricht der berechneten Massenzunahme von $\Delta m = 185,3$ Da.

Dasselbe Ergebnis wurde für SecB E90C erhalten (nicht dargestellt), allerdings wurde bei den Untersuchungen dieser Mutante manchmal ein zweiter, um 40 Da reduzierter Massenpeak

detektiert. Dieser vermeintliche Massenverlust ist ein bekanntes Phänomen bei MALDI-ToF MS Untersuchungen von Proteinen, da die Aminosäure Arginin hierbei zum Verlust ihrer labilen Guanidinium-Gruppe tendiert (persönliche Mitteilung H. Meyer, Medizinisches Proteomzentrum Universität Bochum, 2010). Das dazugehörige Proteinfragment ohne Formamidin wurde in den Spektren bei um 40 Da und 44 Da reduzierte Massen beobachtet.

Des Weiteren konnte im Massenspektrum der spinmarkierten Proben kein Signal von nicht gelabelten SecB-Monomeren detektiert werden. Somit wurde nachgewiesen, dass jedes der entsprechenden Cysteine in jeder der vier Untereinheiten der SecB-Mutanten spezifisch und quantitativ spinmarkiert war.

3.4 Chemische Modifizierung von BPTI

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Modellsubstrat *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI) für die Durchführung der Bindungsstudien mit SecB eingesetzt. Das Chaperon SecB ist ausschließlich in der Lage, mit Proteinen zu wechselwirken, die nicht im nativ gefalteten Zustand vorliegen. BPTI enthält in seiner nativen Form sechs konservierte Cysteine an den Positionen 5, 14, 30, 38, 51 und 55, die durch Ausbildung von drei Disulfidbrücken kovalent verbunden sind (Voet und Voet, 1994). Dies ist schematisch in Abb. 1.3.1 auf Seite 14 illustriert. Um als Substrat für SecB dienen zu können, musste der Trypsin Inhibitor BPTI in einem bindungskompetenten, „linearisierten“ Zustand für SecB vorliegen. Um dies zu realisieren wurden in dieser Arbeit zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden die in der nativen Form des Trypsin Inhibitors enthaltenen Cysteine durch Alanine ersetzt, was die Ausbildung der Tertiärstruktur in der Cystein-freien Mutante all-Ala-BPTI verhindert, siehe hierzu Abschnitt 3.5, Seite 54 ff. Zum anderen wurden die Disulfidbrücken in kommerziell erworbenem BPTI aufgespalten und durch chemische Modifizierung derart blockiert, dass eine Rückfaltung des Substrats verhindert und BPTI in einem stabil entfalteten Zustand erhalten wird. Hierzu wurde BPTI einer Carboxyamidomethylierung unterzogen (siehe Abschnitt 3.4.1). Ähnliche Alkylierungsreaktionen zur Blockierung reaktiver Gruppen an Enzymen sind in der Literatur bereits beschrieben (Ohgi *et al.*, 1981; Wang *et al.*, 2006).

3.4.1 Carboxyamidomethylierung (CAM) des Trypsin Inhibitors BPTI

Damit BPTI als Substrat vom Chaperon SecB gebunden werden kann, war es nötig, einen translokationskompetenten Zustand zu imitieren. Dazu mussten die drei Disulfidbrücken des nativen 6,5 kDa großen Proteins, die seine gefaltete, aktive Tertiärstruktur stabilisieren, aufgebrochen und permanent blockiert werden. Dies wurde mittels Carboxyamidomethylierung der Thiolgruppen realisiert (vgl. Abschnitt 5.6.1, Seite 134). Zu diesem Zweck wurde kommerziell erworbenes BPTI zunächst durch Inkubation mit dem chaotropen Reagenz Guanidin-Hydrochlorid entfaltet. Dieses bricht die polaren Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Proteins auf, wodurch die Sekundärstruktur zerstört wird. Im Anschluss erfolgte die Reduktion der Disulfidbrücken im denaturierten Substrat durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT). Die abschließende Modifizierung der Thiolgruppen erfolgte entsprechend dem in Abb. 3.4.1, Seite 51 beschriebenen Alkylierungsschritt in einer S_N2 -Reaktion durch Zugabe von 25 mM weißem Iodacetamid. Zur Vermeidung unspezifischer Nebenreaktionen wurde auf die Einhaltung der Inkubationszeit von 20 min geachtet und anschließend nicht umgesetztes Reagenz säulenchromatographisch von der Reaktionslösung abgetrennt. Pro carboxyamidomethyliertem Cystein-Rest ergibt sich so ein berechneter Massenzuwachs von $\Delta m_{calc} = 57,05$ Da. Die Carboxyamidomethylierung wurde mittels MALDI-ToF MS analysiert und ist in Abschnitt 3.4.3, Seite 52 detailliert dargestellt.

Das so entfaltete und modifizierte Modellsubstrat cam-BPTI wurde zur späteren Durchführung der Komplexbildungsstudien (Abschnitt 3.5, Seite 54) in einen bindungskompetenten Zustand für das Chaperon SecB überführt.

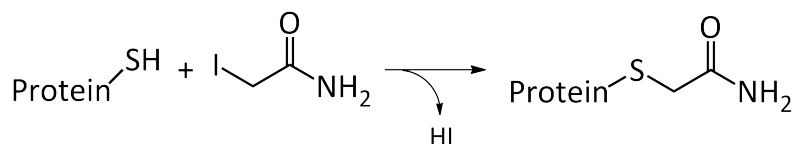


Abb. 3.4.1: Mechanismus der Carboxyamidomethylierung. Iodacetamid reagiert in einer S_N2 -Reaktion mit den Thiolgruppen des Proteins unter Freisetzung eines Äquivalents Iodwasserstoff. Der berechnete Massenzuwachs Δm_{calc} beträgt 57,05 Da.

3.4.2 Fluoreszenzlabeling mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

In einem weiteren Modifizierungsschritt sollte das cam-BPTI an den Aminogruppen der vier im Molekül enthaltenen Lysine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert werden (vgl. Abschnitt 5.6.2, Seite 134). Hierdurch wurde die fluorimetrische Identifizierung BPTI-haltiger Fraktionen nach späteren Komplexbildungsstudien mit SecB (Abschnitt 3.5 und 3.5.2, Seiten 54 und 56) ermöglicht.

Im Anschluss an die im vorangegangenen Abschnitt vorgestellte Carboxyamidomethylierung des BPTI erfolgte deshalb die Fluoreszenzmarkierung. Zur chemischen Modifizierung mit FITC mussten die Aminogruppen in deprotonierter Form vorliegen. Dazu wurde im Anschluss an die säulenchromatographische Abtrennung des nicht umgesetzten Iodacetamids aus dem zuvor beschriebenen Alkylierungsschritt der pH-Wert der Reaktionslösung auf 8,5 erhöht. In einer Additionsreaktion konnte so anschließend die Bindung zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff FITC und den Lysin-Resten stattfinden. Die Reaktion ist nachfolgend schematisch in Abb. 3.4.2 dargestellt. Der durch diese Modifizierung berechnete Massenzuwachs Δm_{calc} beträgt 389,38 Da pro addiertem FITC-Molekül. Die Analyse der Fluoreszenzmarkierung erfolgte ebenfalls mittels MALDI-ToF MS und wird im nachfolgenden Abschnitt erörtert.

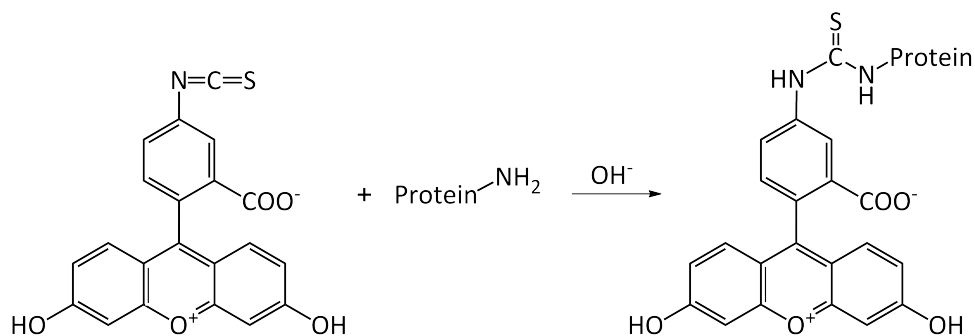


Abb. 3.4.2: Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mittels FITC-Labeling. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC addiert im basischen Milieu an Lysin-Reste des Proteins. Der berechnete Massenzuwachs Δm_{calc} beträgt 389,38 Da pro addiertem FITC-Molekül.

3.4.3 MALDI-ToF MS von chemisch modifiziertem BPTI

Der Erfolg der chemischen Modifizierung des Modellsubstrats BPTI wurde mittels MALDI-ToF MS Analyse (vgl. Abschnitt 5.7.1, Seite 136) verifiziert. Zu diesem Zweck wurden Vergleichsmessungen mit nicht modifiziertem BPTI durchgeführt, wobei alle Proteine unverdaut vermessen wurden.

Abb. 3.4.3(A), Seite 53 zeigt das Ergebnis der Thiolgruppen-Carboxyamidomethylierung des kommerziell erworbenen BPTI. Der blaue Graph stellt den unmodifizierten Massenpeak mit einer experimentell ermittelten Größe von 6 513,1 Da dar. Dieser Befund entspricht der vom Hersteller angegebenen Größe von 65 kDa. Wie bereits in Abschnitt 3.4.1, Seite 50 erläutert, beträgt der berechnete Massenzuwachs für die Alkylierung einer Thiolgruppe mit Iodacetamid $\Delta m_{calc} = 57,05$ Da. Da natives BPTI sechs konservierte Cystein-Reste enthält, wurde ein Massenanstieg um insgesamt $\Delta m_{calc} = 342,3$ Da für eine quantitative Modifizierung des Proteins erwartet. Experimentell ergab sich aus den Massenpeaks der beiden analysierten Proben natives BPTI und cam-BPTI eine Massedifferenz von $\Delta m = 343,7$ Da. Aufgrund dieser Übereinstimmung zwischen berechnetem und experimentellem Massenshift wurde die quantitative Alkylierung aller im nativen BPTI vorhandenen Cystein-Reste nachgewiesen und somit die Auflösung der Tertiärstruktur des Proteins durch Blockierung der drei Disulfidbrücken belegt. Das Ergebnis der Fluoreszenzmarkierung des carboxyamidomethylierten BPTI ist in Abb. 3.4.3(B) dargestellt. Auch hier wurden neben dem fluoreszenzmarkiertem cam-FITC-BPTI natives BPTI (blau) sowie eine Probe des alkylierten cam-BPTI (rot) als Vergleichsproben untersucht. Wie bereits diskutiert, deckte sich auch in dieser Messreihe der berechnete mit dem experimentell bestimmten Massenunterschied von $\Delta m_1 = 348,9$ Da für die sechsfache Carboxyamidomethylierung der Cystein-Reste im cam-BPTI. Der grüne Graph illustriert die Fluoreszenzmarkierung von cam-FITC-BPTI mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat, kurz FITC. Das Massenspektrum des FITC-markierten cam-BPTI weist zwei dominante Massenpeaks unterschiedlicher Intensität bei 6 862,6 Da und 7 256,3 Da auf. Der rechnerische Massenzuwachs für ein addiertes FITC-Molekül beträgt hierbei $\Delta m_{calc} = 389,38$ Da. Aus der Massendifferenz $\Delta m = 349,4$ Da zu nativen BPTI und aufgrund der guten Übereinstimmung der Massenpeaks von cam-BPTI und cam-FITC-BPTI im Bereich von 6 862 Da kann der dominante Massenpeak des cam-FITC-BPTI Spektrums nicht umgesetztem cam-BPTI zugeordnet werden. Der Sekundärpeak dieses Spektrums bei 7 256,3 Da weist einen experimentellen Massenunterschied Δm_2 von 743,1 Da zu unmodifiziertem BPTI auf. Dieser Massenzuwachs entspricht dem berechneten Zuwachs von 731,68 Da für ein einfach fluoreszenzmarkiertes, sechsfach carboxyamidomethyliertes BPTI-Molekül.

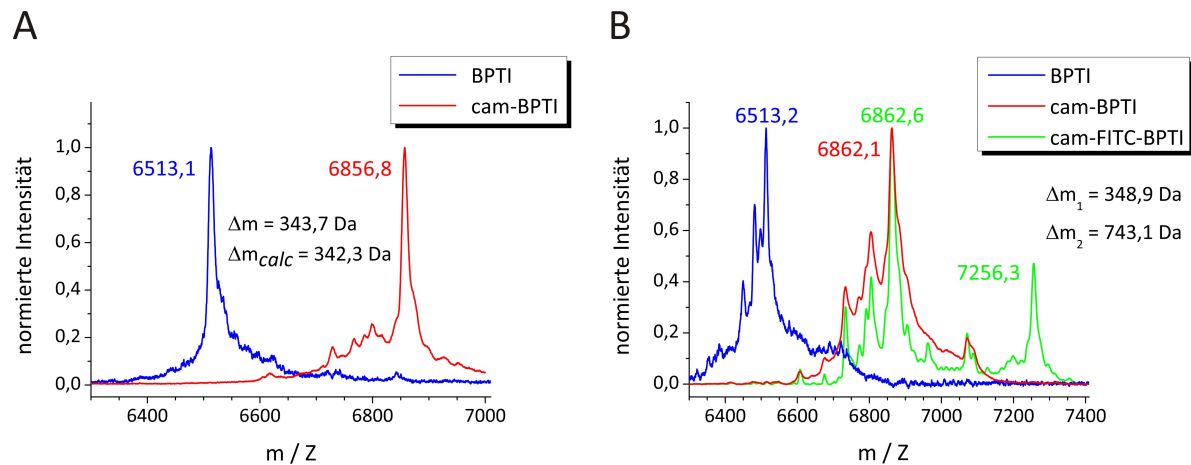


Abb. 3.4.3: Normierte MALDI-ToF MS des chemisch modifizierten BPTI. **(A)** Vergleich von BPTI (blau) und cam-BPTI (rot). Der berechnete Massenzuwachs Δm_{calc} für sechs carboxyamidomethylierte Thiolgruppen beträgt 342,3 Da und stimmt mit dem experimentell bestimmten Zuwachs von $\Delta m = 343,7 \text{ Da}$ überein. **(B)** Vergleich von BPTI (blau) und cam-BPTI (rot) mit cam-FITC-BPTI (grün). Neben dem Massenshift Δm_2 des fluoreszenzmarkierten cam-FITC-BPTI sind deutliche Anteile von sechsfach carboxyamidomethyliertem, jedoch nicht fluoreszenzmarkiertem cam-BPTI (Δm_1) im Spektrum erkennbar.

Sowohl in den Spektren des carboxyamidomethylierten BPTI als auch in denen des FITC gelabelten cam-BPTI waren keinerlei Anteile des chemisch unmodifizierten Trypsin Inhibitors nachzuweisen. Dies lässt den Schluss zu, dass alle Cystein-Reste quantitativ carboxyamidomethyliert wurden. Lediglich die Fluoreszenzmarkierung mit FITC verlief nicht quantitativ, wobei ein einfach fluoreszenzmarkiertes, sechsfach carboxyamidomethyliertes BPTI-Molekül nachgewiesen wurde. Die Intensität des cam-FITC-BPTI Massenpeaks betrug rund 40%. Neben diesem trat ein zweiter Peak im Bereich von 6,8 kDa in Erscheinung, der sechsfach carboxyamidomethyliertem BPTI zugeordnet werden konnte. Eine mögliche Erklärung für das unvollständige Fluoreszenzlabeling könnte auf den sterischen Anspruch der FITC-Moleküle zurückzuführen sein, wodurch der Zugang zu den reaktiven Positionen im cam-BPTI erschwert wurde. Ein weiterer Erklärungsansatz beruht auf dem bei der Addition des Fluoreszenzlabels eingestellten pH-Wert von 8,5. Unter diesen Bedingungen wurde unter Umständen keine ausreichende Deprotonierung der Aminofunktion der Lysin-Reste geschaffen. Der pK_S -Wert der $\epsilon\text{-NH}_3^+$ -Gruppe der Lysine liegt ohne Nachbargruppeneffekte bei 11. Unter Berücksichtigung eines durch die chemische Umgebung abgesenkten pK-Werts sind diese Gruppen reaktiv, reagieren jedoch langsamer mit dem Fluoreszenzlabel. Es ist auch möglich, dass die Addition des FITC an die N-terminale Aminogruppe des cam-BPTI statt an die Aminogruppe der Lysine stattfand, was ebenfalls zu einem nur einfach fluoreszenzmarkierten Protein führen würde.

Spektroskopische Untersuchungen des fluoreszenzgelabelten Proteins zeigten jedoch ein deutliches Absorptionssignal des FITC-Fluoreszenzmarkers bei einer Wellenlänge von 498 nm. Daher konnte das so modifizierte cam-FITC-BPTI für die im anschließenden Kapitel diskutierten Komplexbildungsstudien eingesetzt und die geschaffene Bindungskompetenz zu SecB untersucht werden.

3.5 Komplexbildungsstudien des Chaperons SecB

Die Untersuchung der Substratbindung des Chaperons SecB war bereits Gegenstand früherer Versuche im Rahmen der Diplomarbeit der Autorin (Haimann, 2006). Hierbei wurde bereits die Komplexbildung eines anderen Substrats, der *precursor*-Form des Maltose-Bindungsproteins (preMBP), durch SecB analysiert.

In diesem Teil der Arbeit wurde die Komplexbildung des denaturierten, bindungskompetenten Modellsubstrats cam-BPTI (vgl. Abschnitt 3.4) mit SecB charakterisiert, um den Nachweis eines Chaperon-Substrat-Komplexes zu erbringen.

3.5.1 HPLC-Messungen

Für den Nachweis der Komplexbildung zwischen SecB und dem modifizierten Modellsubstrat BPTI wurde die chromatographische Trennung und Analyse mittels HPLC genutzt (vgl. Abschnitt 5.8.1, Seite 138). Als stationäre Phase wurde eine nach dem Größenausschlussprinzip arbeitende hydrophile Gel-Filtrations-Säule des Typs Zorbax GF-250 verwendet. Die Retentionszeit ist dabei direkt von Größe und Konformation des Moleküls (z. B. sphärisch, spiralisiert, stabförmig) abhängig. Kleinere Moleküle können in die Poren des Säulenmaterials eindringen und werden dort für kurze Zeit aufgehalten, wodurch sich ihre Retentionszeit verlängert. Dagegen werden größere Moleküle vollständig von den Poren des Säulenmaterials ausgeschlossen und eluieren so direkt von der Säule. Die Proteingröße steht dabei in direkter Korrelation mit ihrem Molekulargewicht, d. h. schwerere Proteine eluieren zuerst von der Säule, während leichtere aufgehalten werden und verzögert von der Säule eluieren (Agilent, 2005).

Die Durchführung der Komplexbildung wurde im Folgenden exemplarisch an SecB E90C belegt. Voraussetzung für die Komplexbildungsstudien war ein Substrat, das vom Chaperon SecB gebunden werden konnte. Da SecB nicht in der Lage ist, nativ gefaltete Proteine zu binden, wurde für die Durchführung der Versuche das chemisch modifizierte cam-FITC-BPTI eingesetzt (vgl. Abschnitt 3.4.1, Seite 50 und Abschnitt 3.4.2, Seite 51). Die FITC-Markierung im Substrat erlaubte dabei eine spätere fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der isolierten HPLC-Fractionen. Zur Detektion der Komplexbildung wurde cam-FITC-BPTI langsam bei Raumtemperatur in sub-stöchiometrischen bis äquimolaren Konzentrationen zu einer 10 μ M Lösung SecB E90C zugegeben. Die farblos klare Reaktionsmischung wurde nach kurzer Inkubationszeit sofort auf die HPLC-Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 1,0 ml/min vermessen.

Die Ergebnisse sind vergleichend in Abb. 3.5.1, Seite 55 dargestellt. Freies SecB E90C eluierte nach 8,7 min von der Säule (grünes Elutionsdiagramm). Diese Elutionszeit steht in guter Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen Zeit von 8,2 min für das SecB-Tetramer (Lilly *et al.*, 2009). Bei diesen Untersuchungen wurde eine andere, jedoch ebenfalls nach dem Größenausschlussprinzip arbeitende Trennsäule sowie ein anderes Laufmittel verwendet, was

die Abweichungen zwischen den beobachteten Elutionszeiten erklärt. Unkomplexiertes cam-FITC-BPTI, in rot dargestellt, trat bei einer Retentionszeit von 13,5 min auf. Das Elutionsprofil des Chaperon-Substrat-Komplexes ist in blau dargestellt. Es wurde vermutet, dass die aufgrund der Komplexbildung zwischen SecB E90C und cam-FITC-BPTI erhöhte molekulare Masse des Komplexes zu verkürzten Retentionszeiten führen würde. Da das Substrat bei der Messung im Überschuss zum Chaperon vorlag, wurde ebenfalls eine Abnahme der Intensität des Elutionspeaks von cam-FITC-BPTI nach dessen Komplexierung durch SecB E90C erwartet.

In allen Messungen der untersuchten Komplexe konnte das Verschwinden des cam-FITC-BPTI Peaks beobachtet werden. Dies wird besonders in der Vergrößerung des entsprechenden Bereichs im Elutionsdiagramm deutlich (Inset in Abb. 3.5.1). Der Ausschlag der Substratabsorption (rot) ist im Elutionsdiagramm des Chaperon-Substrat-Komplexes (blau) bei gleicher Substratkonzentration nicht detektierbar und das Elutionsprofil des Chaperon-Substrat-Komplexes ist identisch zu dem des unkomplexierten SecB E90C (grün). Dies war ein erstes Indiz dafür, dass die Komplexbildung zwischen Chaperon und modifiziertem Modells substrat tatsächlich stattfand. Eine Veränderung in der Retentionszeit von SecB wurde jedoch nicht beobachtet, wie der Vergleich der Elutionspeaks des Chaperons zeigt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass nur eine geringe Veränderung in der globalen Geometrie und Größe durch Substratbindung im Vergleich zu freiem SecB E90C stattfand und dies keinen ausgeprägten Einfluss auf die Retentionszeiten ausübte und es so zu keiner Auftrennung der beiden Komponenten kam.

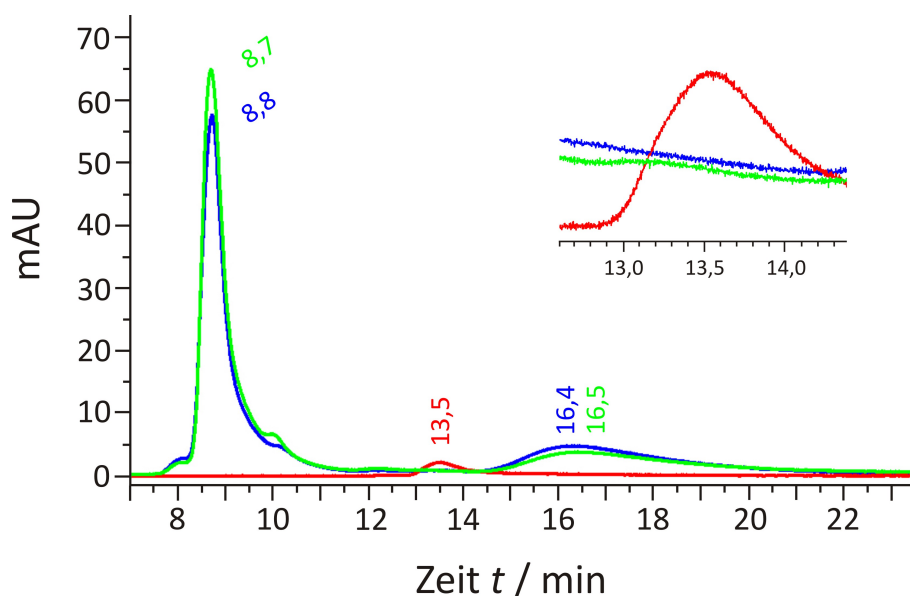


Abb. 3.5.1: HPLC-Komplexbildungsstudie zwischen SecB E90C und cam-FITC-BPTI in Dialysepuffer (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; pH 7,4) bei 280 nm und einer Flussrate von 1,0 ml/min. 10 μ M SecB E90C (grün), 2 μ M cam-FITC-BPTI (rot), 10 μ M SecB E90C im Komplex mit 2 μ M cam-FITC-BPTI (blau). Inset: Vergrößerungsausschnitt des HPLC-Laufs zwischen 12,6 min und 14,4 min.

Um die co-Elution und somit die Komplexbildung zu belegen, wurden die Elutionsfraktionen aus HPLC-Läufen des freien Chaperons, des unkomplexierten cam-FITC-BPTI sowie des Chaperon-

Substrat-Komplexes halbminütlich aufgefangen und die einzelnen Fraktionen zur Analyse mittels SDS-PAGE TCA-gefällt (nicht dargestellt). Freies Chaperon und ungebundenes Substrat konnten einzeln in den ihrer Retentionszeit entsprechenden Fraktionen nachgewiesen werden. Auf den Gelen der Chaperon-Substrat-Komplexe sollten im Fall einer erfolgreichen Komplexbildung in den Fraktionen zwischen 8,0 min und 9,0 min zwei Banden erkennbar sein. Zum einen eine monomere SecB-Bande bei 17,2 kDa und zum anderen eine Bande bei einer molekularen Größe von 6,5 kDa oder 7,2 kDa für das chemisch modifizierte Substrat. Letztere konnte jedoch nicht detektiert werden. Auch konnte sowohl im Bereich um 13,5 min, was der Elutionszeit von freiem cam-FITC-BPTI entspricht, als auch im restlichen Elutionsverlauf der HPLC-Analyse keinerlei Spuren des eingesetzten cam-FITC-BPTI gefunden werden.

Durch das gekoppelte FITC-Fluoreszenzlabel war es jedoch möglich, die einzelnen, halbminütigen Elutionsfraktionen fluorimetrisch zu untersuchen (vgl. Abschnitt 3.5.2), um einen eindeutigen Beweis für eine co-Elution und somit die Komplexbildung zwischen SecB E90C und cam-FITC-BPTI zu erbringen.

Ein möglicher Zerfall des Tetramers bei Substratzugabe konnte ausgeschlossen werden, da zum einen keine wesentlichen Veränderungen zwischen den Elutionsprofilen des freien bzw. komplexgebundenen SecB E90C auftraten. Ein potentieller Zerfall des Tetramers hätte das Auftreten neuer Strukturen im Elutionsverlauf bedingt. Hierzu wurden bereits in früheren Arbeiten Untersuchungen durchgeführt (Haimann, 2006). Die Denaturierung des SecB-Wildtyps durch Aufkochen der Probe und anschließende Untersuchung mittels HPLC ergab einen weiteren, zu höheren Retentionszeiten verschobenen Absorptionspeak, der dem SecB-Dimer zugeordnet werden konnte. Dieser Peak konnte bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen nicht beobachtet werden.

Zum anderen wurde bei der bereits zuvor beschriebenen Analyse der TCA-gefällten HPLC-Fraktionen mittels SDS-PAGE keine ausgeprägte SecB-Bande zu potentiellen Dimer-Elutionszeiten detektiert. Das Auftreten von SecB-Banden auf den SDS-Gelen stimmte mit den Absorptionspeaks des HPLC-Elutionsprofils überein. Zusätzlich wurde auch bei den in Abschnitt 3.8, Seite 87 beschriebenen EPR-Messungen keine durch Aggregatbildung verursachte Trübung der Reaktionsmischung bei Substratzugabe beobachtet, was ebenfalls gegen einen Zerfall des SecB-Tetramers spricht.

3.5.2 UV/Vis- und Fluoreszenzmessungen der Chaperon-Substrat-Komplexe

Um die co-Elution von SecB E90C und fluoreszenzmarkiertem cam-FITC-BPTI zu verifizieren, wurden die halbminütig gesammelten HPLC-Fraktionen (Abschnitt 3.5.1) mittels UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Diese Untersuchungen wurden in der Fachrichtung Physikalische Chemie des Fachbereichs Chemie der TU Kaiserslautern durchgeführt (Abschnitt 5.9.2,

Seite 139).

Zur Bestimmung der Anregungswellenlänge λ_{ex} für die späteren Fluoreszenzmessungen wurden zunächst UV/Vis-Spektren der Proteine SecB E90C und cam-FITC-BPTI sowie des gelösten Fluoreszenzfarbstoffs FITC über einen Wellenlängenbereich von 200 - 700 nm aufgezeichnet, um deren Absorptionsmaxima zu ermitteln.

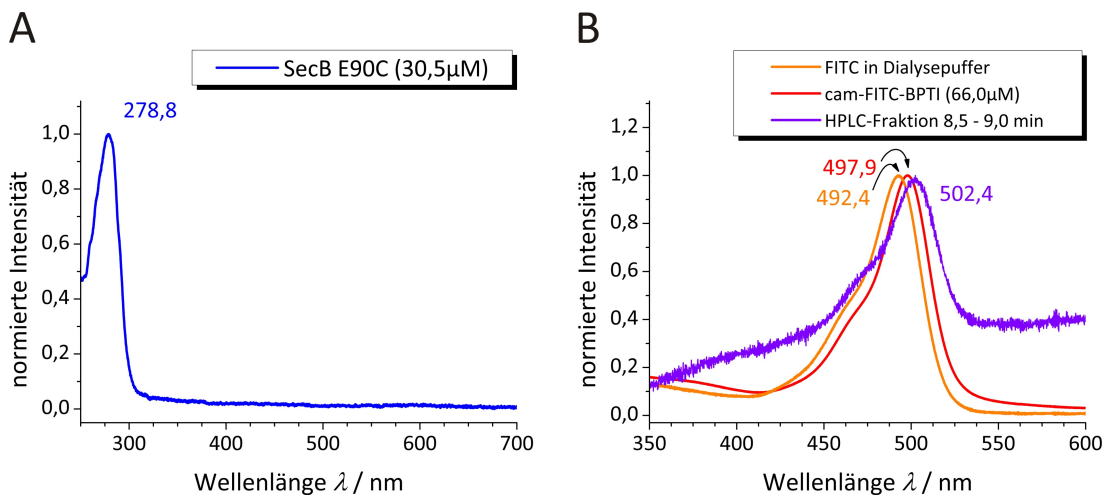


Abb. 3.5.2: Komplexbildungsstudie zwischen SecB E90C und cam-FITC-BPTI. **(A)** UV/Vis-Spektrum SecB E90C (30,5 μM) zur Bestimmung der Anregungswellenlänge λ_{ex} . **(B)** UV/Vis-Spektroskopie zur Charakterisierung des freien Fluoreszenzfarbstoffs FITC gelöst in Dialysepuffer (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; pH 7,4) (orange) und fluoreszenzmarkiertem cam-FITC-BPTI (rot) sowie Vergleich mit der HPLC-Fraktion zwischen 8,5 - 9,0 min des Chaperon-Substrat-Komplexes aus Abb. 3.5.1 (violett).

Abb. 3.5.2(A) stellt das UV/Vis-Absorptionsprofil des Chaperons SecB E90C dar. Die Absorption von Proteinen basiert auf der UV-Absorption der Reste der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sowie in geringem Maße von Phenylalanin. Maßgeblich ist das Absorptionsmaximum von Tryptophan bei 280 nm, weniger das der beiden anderen Aminosäuren bei 275 nm bzw. 257 nm (Richter, 2003). Da die Anteile dieser drei Aminosäuren in verschiedenen Proteinen variieren, treten leichte Unterschiede in der Lage der Absorptionsmaxima von Proteinen auf. Das Absorptionsmaximum des Chaperons SecB E90C lag bei 278,8 nm und es waren keine weiteren Absorptionen über den gemessenen Wellenlängenbereich erkennbar.

Abb. 3.5.2(B) zeigt die Absorption des in Dialysepuffer gelösten Fluoreszenzfarbstoffs FITC (orange). Das Absorptionsmaximum lag bei 492,4 nm. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem Literaturwert des in Wasser gelösten FITC von 493 nm (McKinney *et al.*, 1964). Der rote Graph in Teilabbildung (B) repräsentiert das Absorptionsverhalten des fluoreszenzmarkierten Modellsubstrats cam-FITC-BPTI mit einer maximalen Absorption bei 275,4 nm (nicht im Teilausschnitt enthalten) und 497,9 nm. Die kurzwellige Absorption ist auf den Proteinanteil zurückzuführen und die Absorption im Bereich von 500 nm auf den Fluoreszenzmarker FITC. Die Absorptionsverschiebung von 5,5 nm zwischen freiem und Protein-gebundenem Fluoreszenzfarbstoff im höherwelligen Bereich deutet auf das Vorliegen einer unterschiedlichen chemischen

Umgebung des Fluoreszenzlabels hin und war so ein weiterer Beleg für die erfolgreiche Koppelung des FITC an den Trypsin Inhibitor. Die maximale Absorption von cam-BPTI, welches nicht an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, lag bei 275,6 nm (nicht dargestellt). In diesem Spektrum traten keine weiteren Absorptionen auf. Somit konnten die Absorptionen im Bereich von 280 nm des cam-FITC-BPTI-Spektrums ebenfalls auf den Proteinanteil und die Absorption im Bereich von 500 nm eindeutig auf das Fluoreszenzlabel FITC zurückgeführt werden.

Die dritte, in violett dargestellte Absorptionskurve in Abb. 3.5.2(B) mit einem Absorptionsmaximum bei 502,4 nm stammte von der Untersuchung der im vorangegangenen Abschnitt diskutierten Chaperon-Substrat-Komplex HPLC-Fraktion der Elutionszeit 8,5 - 9,0 min. Während der chromatographischen Analyse mittels HPLC (vgl. Abb. 3.5.1, Seite 55) war eine Auftrennung von Chaperon-Substrat-Komplex und freiem SecB E90C nicht möglich gewesen. Auch konnte die SDS-PAGE Analyse der TCA-gefällten Proben der Elutionszeit 8,5 - 9,0 min keine co-Elution der beiden Proteine belegen. Jedoch konnte aus den Untersuchungen diese Retentionszeit der Elution des Chaperons SecB E90C zugeordnet werden. Neben dem Verschwinden des cam-FITC-BPTI Elutionspeaks zur Retentionszeit des freien cam-FITC-BPTI bei 13,5 min als Indiz konnte jedoch kein unumstößlicher Nachweis für dessen Komplexierung durch SecB E90C erbracht werden.

In diesem UV/Vis-Spektrum war nun deutlich eine Absorption bei 502,4 nm zu erkennen. Dies stellte zum einen eine weitere bathochrome Absorptionsverschiebung im Vergleich zu freiem cam-FITC-BPTI (roter Graph in Abb. 3.5.2) dar, was erneut auf eine veränderte chemische Umgebung des Fluoreszenzfarbstoffs FITC hindeutete und somit einen weiteren Hinweis für die Komplexierung von cam-FITC-BPTI durch SecB E90C liefert. Zum anderen konnte somit in dieser Messung eine durch den an cam-FITC-BPTI gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff FITC verursachte Absorption in der Elutionsfraktion zur Retentionszeit von SecB E90C nachgewiesen werden. Da, wie bereits zuvor erörtert, keine weiteren Absorptionen in den UV/Vis-Spektren der vermessenen reinen Proteine SecB E90C und cam-BPTI im Bereich von 500 nm auftraten, wurde hiermit belegt, dass diese Absorption von dem an cam-FITC-BPTI gekoppeltem FITC stammt. Außerdem wurde bei der Analyse der HPLC-Fraktionen, die zur Retentionszeit von ungebundenem cam-FITC-BPTI bei 13,5 min aufgefangen wurden, keine Absorption im Bereich von 500 nm detektiert. Dieser Befund deckt sich mit dem Verschwinden des cam-FITC-BPTI in der HPLC-Analyse des Chaperon-Substrat-Komplexes in diesem Bereich. Somit lag cam-FITC-BPTI von SecB E90C komplexiert vor, so dass beide Proteine folglich zur Retentionszeit des Chaperons co-eluierten.

Die Resultate der Fluoreszenzmessungen der entsprechenden HPLC-Fraktionen (nicht dargestellt) deckten sich alle mit denen der UV-Messungen und bestätigten die Komplexierung.

Die Anregung des in Dialysepuffer gelösten, reinen Fluoreszenzlabels FITC ergab Fluoreszenz-emissionsbanden λ_{em} bei 516 nm und die Anregung von cam-FITC-BPTI ergab Emissionsbanden bei 519 nm. Der Literaturwert für die Emission von Fluoreszein gelöst in Wasser liegt bei 521 nm

(McKinney *et al.*, 1964). Sowohl bei Anregung mit einer Wellenlänge λ_{ex} von 286 nm als auch bei Anregung mit 502 nm, was den Absorptionsmaxima der UV/Vis-Spektren entsprach, traten bei Analyse der HPLC-Fraktion 8,5 - 9,0 min Emissionsbanden im Bereich von 517 nm auf. Dies verdeutlichte noch einmal, dass die Emissionsbanden aus derselben Absorption des cam-FITC-BPTI hervorgingen und von am Protein fusioniertem FITC stammen mussten. Neben den Fraktionen des Chaperon-Substrat-Komplexes traten in den weiteren Proben keine Fluoreszenzsignale bei Anregung mit λ_{ex} auf.

Die Kombination von HPLC-, UV/Vis- und Fluoreszenzmessungen ermöglichte so den Nachweis der Komplexbildung zwischen SecB und dem Modellsubstrat. Unter dieser Voraussetzung wurden die EPR-spektroskopischen Untersuchungen zur Abstandsänderung zwischen substratgebundenen und substratfreien Chaperonsystemen durchgeführt (siehe Kapitel 3.8).

3.6 Das rekombinante Modellsubstrat BPTI

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modellsubstrat zur Komplexbildung mit dem Chaperon SecB sowie zur Durchführung der EPR-spektroskopischen Untersuchungen ist der *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI). In seiner natürlichen Form wird BPTI durch Ausbildung dreier Disulfidbrücken zwischen den sechs konservierten Cysteinen stabilisiert. Da SecB ausschließlich in der Lage ist, mit nicht-nativ gefalteten Proteinen zu wechselwirken, musste der Trypsin Inhibitor BPTI in einem bindungskompetenten, „linearisierten“ Zustand vorliegen, um als Substrat für SecB dienen zu können. Dies konnte einerseits, wie bereits ausführlich in Kapitel 3.4 beschrieben, durch chemische Modifizierung und Blockierung der Thiolgruppen realisiert werden. Ein zweiter Ansatz, der die chemische Modifizierung des Proteins umgeht, besteht darin, die in der nativen Sequenz des Trypsin Inhibitors enthaltenen Cysteine durch Alanine zu ersetzen, was ebenfalls die Ausbildung der Tertiärstruktur verhindert. Diese Cystein-freie Mutante wird als all-Ala-BPTI₁₋₅₈ bezeichnet.

3.6.1 all-Ala-BPTI₁₋₅₈

Ausgehend von der genetischen Sequenz des BPTI (*European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI); Datenbank: *European Nucleotide Archive* (ENA); Code: X03365) (Anderson und Kingston, 1983; Banham *et al.*, 2006) wurden mit Hilfe des Programms Clone Manager Suite 7 die für die in der nativen Sequenz vorkommenden sechs Cysteine codierenden Codons gegen Alanin-codierende Codons ausgetauscht. Die Veränderungen der entsprechend zu mutierenden Codons sind in Tab. 3.6.1, Seite 68 dokumentiert. Ebenfalls wurden die für die weiteren Klonierungsarbeiten erforderlichen Restriktionsschnittstellensequenzen für die Enzyme NdeI und XhoI vor und hinter der Gensequenz des all-Ala-BPTI₁₋₅₈ eingefügt. Zudem wurde die Sequenz einer Thrombinschnittstelle zwischen C-terminalem Sequenzende des Proteins und XhoI-Schnittstelle inseriert. Das entsprechende Oligonukleotid wurde von der Firma Mr. Gene GmbH, Regensburg bezogen.

3.6.1.1 CHARAKTERISIERUNG UND LIGATION DES ALL-ALA-BPTI₁₋₅₈-GENS

Die 174 bp große all-Ala-BPTI₁₋₅₈ codierende Gensequenz, flankiert von der Thrombinschnittstellensequenz und den Sequenzen der Restriktionsschnittstellen NdeI und XhoI wurde von der Firma Mr. Gene GmbH im Vektor pMA erworben. Die zugehörige Vektorkarte ist in Abb. A.1.3 auf Seite 156 im Anhang dargestellt. Dieser Vektor trägt eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker, war aber aufgrund eines fehlenden Promotors für die Proteinexpression ungeeignet. Daher wurde die Zielsequenz aus dem pMA-Vektor in den Vektor pET-20b(+) umkloniert. Der

Expressionsvektor pET-20b(+) ist besonders geeignet, da er zur späteren Isolierung und Aufreinigung des all-Ala-BPTI₁₋₅₈-Proteins über eine 6x His-Tag-Sequenz verfügt.

Bevor das all-Ala-BPTI₁₋₅₈-Gen zur Umklonierung aus dem pMA-Vektor heraus amplifiziert werden konnte, musste es in ausreichend hoher Konzentration vorliegen. Dazu wurde der in Pulverform gelieferte pMA-Vektor in 10 µl Puffer (2,5 mM Tris-HCl; pH 8,0) gelöst und 1 µl einer 1:10-Verdünnung mit dem gleichen Puffer zur Vermehrung des Plasmids in XL1-Blue Zellen transformiert (vgl. Abschnitt 5.3.4.7, Seite 127). Das Transformationsprodukt wurde auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden 2xYT-Ampicillin Übernachtsmedien mit je einer isolierten Kolonie angeimpft und diese Kulturen bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung des vermehrten Plasmids aus den gewachsenen Übernachtskulturen (vgl. Abschnitt 5.3.4.8, Seite 127).

Im Anschluss daran wurde das Genkonstrukt mit Hilfe der Primer *T7 forward* und *M13 reverse* (vgl. Abschnitt 5.1.9, Seite 116) aus dem pMA-Vektor heraus amplifiziert. Das Ergebnis dieser PCR ist in Bahn 1 der Abb. 3.6.1(A) auf Seite 62 dargestellt.

Deutlich ist das Auftreten einer Bande in der Größenordnung von 370 bp zu erkennen. Dieser Befund deckt sich mit der berechneten Größe von 368 bp für das im pMA-Vektor zwischen den Primern *T7 forward* und *M13 reverse* amplifizierte Gensegment. Um den PCR-Ansatz des erfolgreich amplifizierten NdeI-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-Thrombinschnittstelle-XhoI-Genabschnitts von Primern und nicht umgesetzten Nukleotiden zu befreien, wurde dieser mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits aufgereinigt und die DNA-Konzentration photometerisch bestimmt (vgl. Abschnitt 5.3.4.3, Seite 125 und 5.3.4.1, Seite 125).

Es erfolgte ein Doppelverdau der gereinigten DNA sowie des pET-20b(+) Vektors mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und XhoI (vgl. Abschnitt 5.3.4.4, Seite 126). Dadurch wurden am „all-Ala-BPTI“-Insert die für die spätere Ligation notwendigen korrekten *sticky ends* generiert und der Expressionsvektor pET-20b(+) entsprechend an den vorgesehenen Ligationsstellen geöffnet. Nach erneuter Aufreinigung beider Komponenten mit dem NucleoSpin® Extract II Kit und photometrischer Konzentrationsbestimmung der DNA wurde der geöffnete pET-20b(+) Vektor dephosphoryliert (vgl. Abschnitt 5.3.4.5, Seite 126) und direkt im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt, um eine mögliche Religation der vektoreigenen DNA-Fragmente zu verhindern. Nach der Konzentrationsbestimmung der dephosphorylierten, aufgereinigten Vektor-DNA wurde diese entsprechend mit dem geschnittenen „all-Ala-BPTI“-DNA-Insert im Verhältnis 1:2 über Nacht bei Raumtemperatur durch die T4 DNA-Ligase ligiert (vgl. Abschnitt 5.3.4.6, Seite 127). Der Ligationsansatz wurde in ultra-kompetente XL1-Blue Zellen transformiert, welche auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Von den gewachsenen Kolonien wurden isolierte Kolonien gepickt und diese einer Kolonie-PCR mit dem Primerpaar *T7 forward/T7 reverse* unterworfen (vgl. Abschnitt 5.3.2, Seite 123). Als Kontrolle wurde ebenfalls ein PCR-Ansatz mit dem nicht-

ligierten Vektor pET-20b(+) und denselben Primern durchgeführt. Alle PCR-Ansätze wurden zur Charakterisierung vergleichend auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Abb. 3.6.1(B), Seite 62).

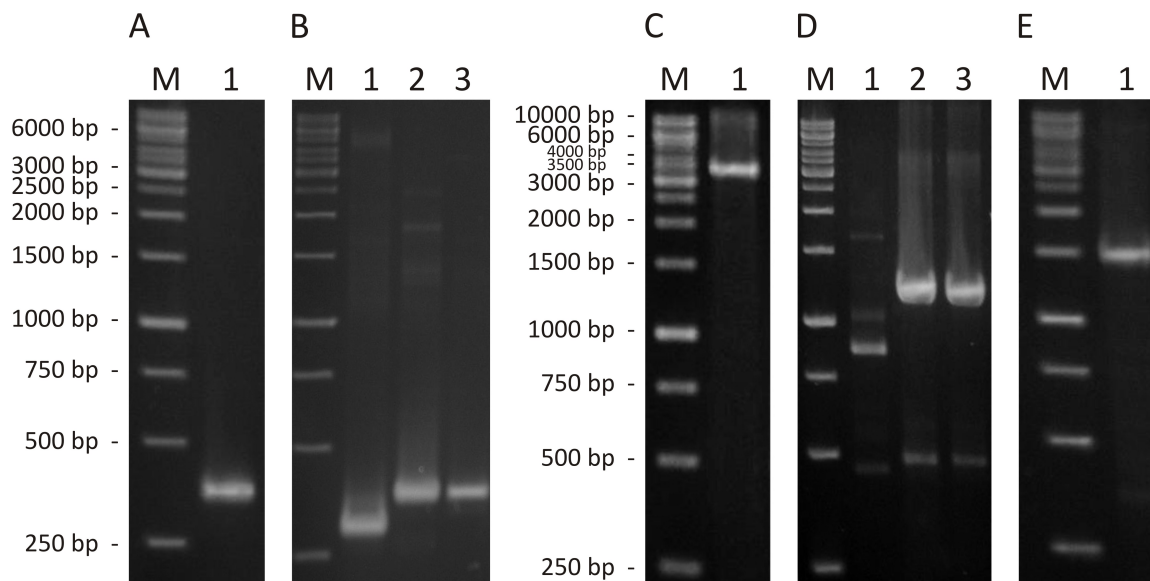


Abb. 3.6.1: 2%ige Agarosegele der Klonierungsschritte von all-Ala-BPTI₁₋₅₈; Bahn M: GeneRuler™1 kb DNA Ladder. **(A)** Bahn 1: PCR-Ansatz mit den T7 *for*- und M13 *rev*-Primern von 10 ng all-Ala-BPTI₁₋₅₈ im Vektor pMA. **(B)** Bahn 1: PCR des Vektors pET-20b(+) mit T7 *for*- und T7 *rev*-Primern; Bahnen 2, 3: Kolonie-PCR des in den pET-20b(+) Vektor ligierten „all-Ala-BPTI“-Inserts mit T7 *for*- und T7 *rev*-Primern. **(C)** Bahn 1: Restriktionsdoppelverdau des His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-tragenden Vektors pET-20b(+) mit den Endonukleasen NdeI (1 µl) und XbaI (1 µl). **(D)** PCR-Ansätze mit den Primern GFP new long XbaI *for* und EnGFP NdeI *rev* und dem GFP-tragenden Vektor pLVTHM als Template. Bahn 1: gescheiterter Reaktionsansatz; Bahnen 2, 3: erfolgreiche Reaktionen. **(E)** Bahn 1: Kolonie-PCR der Ligation der GFP-Gene über die Schnittstellen NdeI und XbaI in den His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-tragenden pET-20b(+) Vektor mit den Primern T7 *for* und T7 *rev*.

Im Vergleich zum nicht-ligierten Vektor, dessen Bande in Bahn 1 bei etwa 300 bp in Erscheinung tritt, sind deutlich die zu höherer Masse hin verschobenen Banden in den Bahnen 2 und 3 bei ca. 370 bp zu erkennen. Die berechnete Größe für das im pET-20b(+) Vektor zwischen den T7 *forward*-/T7 *reverse*-Primern einligierte NdeI-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-Thrombinschnittstelle-XhoI-Gensegment beträgt 369 bp. Die kalkulierte Größe zwischen den T7 *forward*-/T7 *reverse*-Primern des unligierten pET-20b(+) Vektors beläuft sich auf 300 bp. Diese Daten stehen in exzellenter Übereinstimmung mit den experimentellen Befunden. Somit wurde gezeigt, dass das „all-Ala-BPTI“-Insert erfolgreich in den pET-20b(+) Vektor ligiert wurde.

Das Resultat wurde zusätzlich durch eine Sequenzanalyse bestätigt. Dazu wurden mit Klonen, die für den „all-Ala-BPTI₁₋₅₈“-Insert tragenden pET-20b(+) Vektor positiv getestet waren, ampicillinhaltige 2xYT-Übernachtmedien angeimpft. Die gewachsenen Kulturen wurden einer Plasmidisolierung unterzogen und zur sicheren Verifizierung der Ligationsergebnisse wurden die Plasmide sequenziert. Alle Sequenzen waren vollständig und fehlerfrei (nicht dargestellt) und das getestete genetische Material konnte somit für die weiteren Arbeiten verwendet werden.

3.6.1.2 EXPRESSIONSVERSUCHE VON HIS₆^T-ALL-ALA-BPTI₁₋₅₈

Zur Proteingewinnung wurden die zuvor aus XL1-Blue Zellen isolierten pET-20b(+) Plasmide, welche sowohl die genetische Information für all-Ala-BPTI₁₋₅₈ als auch die des 6x His-Tags tragen, in *E. coli* KRX-Zellen transformiert (vgl. Abschnitt 5.3.4.7 und 5.3.4.8). Die Gründe für den Wechsel der Zelllinie zur Proteingewinnung wurden bereits eingehend in den Abschnitten 3.1.4 und 3.2 dargelegt. Der Erfolg der Transformation wurde erneut durch eine Kolonie-PCR mit dem Primerpaar T7 *forward*/T7 *reverse* bestätigt. Die transformierten KRX-Zellen wurden auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Mit jeweils einer der gewachsenen, monoklonalen Kolonien wurden 2xYTA-Übernachtskulturen angeimpft, aus denen, wie in Abschnitt 5.4.5 beschrieben, wiederum ampicillinhaltige *large-scale* Kulturen angelegt und inkubiert wurden. Nach Abstoppen des Zellwachstums durch Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Die resultierenden Zellpellets wurden zur Entfernung von Nährmediumrückständen gewaschen, erneut abzentrifugiert und in Resuspendierungspuffer aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. Abschnitt 5.4.4.1, Seite 129). Durch Zentrifugation bei 18 900x g wurden die löslichen Zellproteine von Zelltrümmern und *inclusion bodies* abgetrennt. Der lösliche Überstand wurde durch Ultrazentrifugation bei 184 000x g von verbliebenen Schwebstoffen, welche die spätere Isolierung stören können, gereinigt. Das so erhaltene klare Lysat wurde anschließend für die Nickel-Affinitätschromatographie (vgl. Abschnitt 5.4.4.2, Seite 130) eingesetzt.

Das His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ konnte in keiner der erhaltenen Säulen-Fractionen der Nickel-Affinitätschromatographie (Durchlauf, Wasch- und Elutionsfraktionen) nachgewiesen werden. Da es sich bei His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ um ein *E. coli*-fremdes Protein handelt, war es möglich, dass das gebildete Protein als für den eigenen Zellhaushalt unbrauchbares Stoffwechselprodukt in *inclusion bodies* eingeschlossen wurde. Deshalb wurden zum Aufschluss der *inclusion bodies* die festen Zellrückstände des unlöslichen Zentrifugationspellets in Guanidin-Hydrochlorid-haltigem Denaturierungspuffer resuspendiert und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert (vgl. Abschnitt 5.4.5.2, Seite 132). Nach beendeter Inkubation war die zuvor trübe Suspension klar geworden und wurde erneut zentrifugiert, um Zelltrümmer und Schwebstoffe von den sich nun im Überstand befindenden Proteinen aus den aufgeschlossenen *inclusion bodies* abzutrennen. In der Analyse mittels SDS-PAGE konnte jedoch auch hier kein His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ nachgewiesen werden.

Obwohl es unwahrscheinlich ist, dass His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ als *E. coli*-fremdes Protein ohne spezielle Signalsequenzen von den Bakterienzellen in das Nährmedium sezerniert worden war, wurde diese Möglichkeit in einem nächsten Schritt überprüft. Zu diesem Zweck wurden 750 ml des bei der Zellernte anfallenden Nährlösungsüberstands der induzierten Zellen wiederholt über eine Ni-NTA-Agarose Säule gepumpt, um eine Koordination des durch das große Nährmediumvolumen verdünnten 6x His-Tag-Proteins an das Säulenmaterial zu ermöglichen und dieses

somit aus dem Medium heraus in der Säule anzureichern. Die jeweiligen säulenchromatographischen Fraktionen wurden mittels Bradford-Reagenz und BCA-Test untersucht. In keiner der resultierenden Fraktionen konnte Protein nachgewiesen werden.

Daraufhin erfolgte, wie in der Diplomarbeit von Amann ausführlich beschrieben, die Durchführung eines Western-Blots (Amann, 2009). Getestet wurden die bei der zuvor beschriebenen Aufarbeitung und beim Aufschluss der *inclusion bodies* anfallenden Fraktionen. His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ E90C diente hierbei als Positivkontrolle. Die durch eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennten Proteine der jeweiligen Proben wurden elektrophoretisch vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Trägermembran übertragen. Durch die angelegte Spannung wurden die Proteinbanden aus dem Gel auf die Membran übertragen. Mit dem monoklonalen Maus-Anti-His₆-Antikörper (Verdünnung 1:3 000) wurden 6x His-Tag-tragende Proteine markiert. Zur Detektion dieses primären Maus-Antikörpers wurde der polyklonale sekundäre Ziegen-Anti-Maus IgG-Antikörper (Verdünnung 1:5 000) verwendet, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, welche die chemilumineszierende Reaktion mit ECL katalysiert. Die hierbei freigesetzte Lumineszenz wurde mittels Röntgenfilm detektiert. Es zeigte sich hierbei, dass die Positivkontrolle His₆^T-SecB₁₋₁₅₅ E90C auf dem belichteten Film detektierbar war. Jedoch waren trotz erfolgreichem Western-Blot auf der gesamten Membran keine von His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ stammenden Banden nachweisbar.

3.6.1.3 KONTROLLE DER EXPRESSION VON HIS₆^T-ALL-ALA-BPTI₁₋₅₈ MITTELS ENGFP

Da His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ in keinem der bisherigen Aufarbeitungs- und Isolierungsschritte nachzuweisen war, wurde im Folgenden überprüft, ob das Protein überhaupt in den Zellen gebildet wurde. Dazu wurde die 717 bp große Nukleotid-Sequenz des *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EnGFP) in den His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-tragenden pET-20b(+) Vektor inkloniert. Hierdurch kann nach Induktion der *E. coli*-Zellen die Expression des His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ durch die Fluoreszenz des gleichzeitig gebildeten EnGFP in den Zellen nachgewiesen werden. EnGFP fluoresziert bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün (Chalfie *et al.*, 1994). Durch die Untersuchung der Zellen mit einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (LSM), das mit einem Argon-Laser ausgestattet ist, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert, wird das EnGFP angeregt. Es emittiert ein Fluoreszenzsignal mit einer Wellenlänge von 509 nm. So kann die Bildung des His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-EnGFP in den Zellen überprüft und verifiziert werden.

Um die genetische Information für EnGFP in den His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-tragenden pET-20b(+) Vektor einzuklonieren, wurde dieser zunächst aus angelegten XL1-Blue Zellen isoliert (vgl. Abschnitt 5.3.4.8, Seite 127) und an den geplanten Ligationspunkten, der NdeI- und der XbaI-Schnittstelle, durch die entsprechenden Restriktionsenzyme geöffnet (vgl. Abschnitt 5.3.4.4, Seite 126). So konnte die EnGFP-Sequenz in den weiteren gentechnischen Arbeiten unmittel-

bar vor die Sequenz des His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ eingefügt werden. Anschließend wurden die Schnittenden des Vektors dephosphoryliert, um eine spätere Religation zu vermeiden und mittels NucleoSpin[®] Extract II Kit aufgereinigt (vgl. Abschnitt 5.3.4.5, Seite 126 und Abschnitt 5.3.4.3, Seite 125). Abb. 3.6.1(C) auf Seite 62 zeigt den erfolgreichen Doppelverdau. In Bahn 1 ist die Bande des geöffneten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-tragenden pET-20b(+) Vektors deutlich zwischen 3 500 bp und 4 000 bp zu erkennen. Die berechnete Größe für den geschnittenen Vektor beträgt 3 746 bp und steht somit in Übereinstimmung mit dem experimentellen Befund.

Das genetische Material für EnGFP wurde von Dr. Jakupovic (Arbeitskreis Kietzmann, TU Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt und lag im Vektor pLVTHM vor. Mit Hilfe des Programms Clone Manager Suite 7 wurden Primer entworfen, die an die Sequenz des EnGFP binden. Diese Primer tragen ebenfalls die Informationen zur Generierung der für die spätere Ligation mit dem geöffneten pET-20b(+) Vektor benötigten Restriktionsschnittstellen NdeI und XbaI, die so vor bzw. hinter der Sequenz des EnGFP eingefügt wurden. Die Primer wurden als GFP new long XbaI *forward* bzw. EnGFP NdeI *reverse* bezeichnet (vgl. Abschnitt 5.1.9, Seite 116) und von Sigma Life Science bezogen. Beide Primer enthalten an ihrem 5'-Ende eine Sequenz von vier Schutzbasen (CACC), gefolgt von den jeweiligen Sequenzen zur Generierung der Restriktionsschnittstellen XbaI (TCTAGA) im GFP new long XbaI *forward*-Primer und NdeI (CATATG) im EnGFP NdeI *reverse*-Primer. Die darauffolgenden 25 Basen des *forward*-Primers binden an einen Sequenzabschnitt im pLVTHM Vektor, der 490 bp vor dem Sequenzbeginn des EnGFP-Gens liegt. Die Wahl dieser Position war nötig, da es aufgrund von Sequenzwiederholungen in der diesseitigen EnGFP-Umgebung im Vektor ansonsten zu Mehrfachpaarungen möglicher Primer käme, was zur Bildung unspezifischer Produkte für die spätere Ligation führen würde. Im *reverse*-Primer war die Paarung mit 28 Basen an das exakte EnGFP-Sequenzende möglich. Diese 28 Basen folgen im *reverse*-Primer unmittelbar auf die Basen der NdeI-Schnittstelle. Durch eine PCR (vgl. Abschnitt 5.3.1, Seite 122) mit diesen Primern wurde das EnGFP-Gen mit den umgebenden Restriktionsschnittstellen NdeI und XbaI sowie 490 Vektorartefaktbasenpaaren aus dem Vektor pLVTHM gewonnen. Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (vgl. Abb. 3.6.1(D), Seite 62). In den Bahnen 1 - 3 wurden die jeweiligen PCR-Ansätze aufgetragen. In Bahn 1 tritt eine Bande bei knapp 900 bp auf. Die Banden der Reaktionsprodukte in den Bahnen 2 und 3 liegen bei etwa 1240 bp, was der berechneten Größe für die amplifizierte Gensequenz von 1227 bp gut entspricht. Die PCR-Ansätze der Bahnen 2 und 3 waren also erfolgreich und ergaben das gewünschte PCR-Produkt. Dieses wurde im Anschluss mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit aufgereinigt. Zur Generierung der zum doppelt geschnittenen pET-20b(+) Vektor entsprechenden *sticky ends* wurde das PCR-Produkt mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und XbaI verdaut und dieser Verdau erneut aufgereinigt. Die DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt (vgl. Abschnitt 5.3.4.1, Seite 125) und das so vorbereitete EnGFP-Insert wurde daraufhin mit dem analog präparierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-tragenden pET-20b(+) Vektor durch die T4 DNA-Ligase im Verhältnis 2:1 über Nacht bei Raumtemperatur ligiert (vgl. Abschnitt 5.3.4.6,

Seite 127). Nach Transformation des Ligationsansatzes sowie einer Insert-freien Kontrollreaktion in ultra-kompetente KRX-Zellen wurden die Transformanten auf ampicillinhaltige LB-Platten (vgl. Abschnitt 5.3.4.7, Seite 127) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden einzelne gepickt und einer Kolonie-PCR mit den Primern T7 *forward*/T7 *reverse* unterzogen (vgl. Abschnitt 5.3.2, Seite 123). Die Bande bei ca. 1 500 bp in Bahn 1 der Abb. 3.6.1(E), Seite 62 zeigt den Erfolg der Ligation. Die berechnete Größe der zwischen den T7 *forward*-/T7 *reverse*-Primern amplifizierten Sequenz, welche neben den Artefaktbasen des pLVTHM Vektors die Gensequenzen für His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ sowie EnGFP enthält, beträgt 1544 bp und entspricht dem experimentellen Befund. Die Vektorkarte des neu generierten Plasmids ist in Abb. A.1.4 auf Seite 157 im Anhang dargestellt.

Von den erfolgreich ligierten Bakterienkolonien einer Kolonie-PCR LBA-Agarplatte wurden einige Kolonien zur Inokulation in ampicillinhaltige 2xYT-Übernachtsmedien überführt. Es wurden ebenfalls Kontrollmedien mit den EnGFP-freien His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-tragenden pET-20b(+) Vektoren in KRX-Zellen angeimpft. 10 µl der jeweiligen induzierten Zellsuspensionen wurden nach entsprechender Expressionszeit auf Objektträger aufgetragen, mit Deckgläsern abgedeckt und die Emission nach Anregung mit einem Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm am LSM untersucht (vgl. Abschnitt 5.9.1, Seite 139).

Die resultierenden LSM-Aufnahmen sind in Abb. 3.6.2 dargestellt. Wie im Vergleich zu den His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-exprimierenden Kontrollzellen (Abb. 3.6.2(A)) ohne EnGFP zu sehen ist, wurde auch in den Zellen, die das EnGFP-gelabelte Protein exprimieren sollten (Abb. 3.6.2(B)), kein Fluoreszenzsignal detektiert. Dies bedeutet, dass His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ nicht in den Zellen exprimiert wurde.

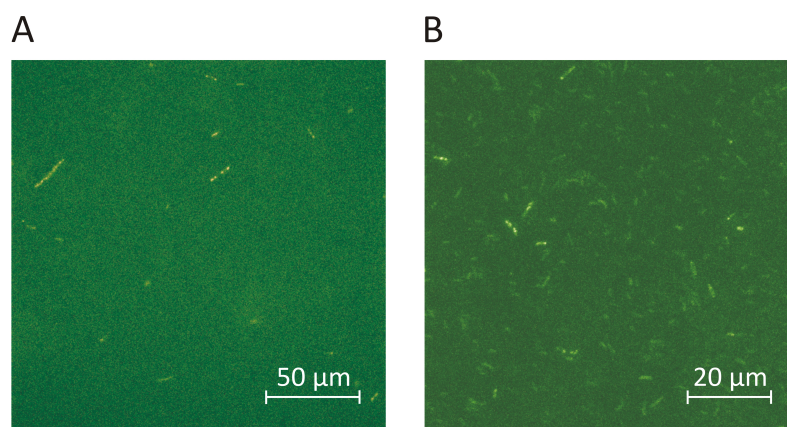


Abb. 3.6.2: LSM-Aufnahmen der GFP-Fluoreszenz mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. **(A)** Mit Rhamnose (0,1% Endkonzentration) induzierte Kontroll-KRX-Zellen, die den pET-20b(+) Vektor mit der genetischen Information für His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ tragen. **(B)** Mit Rhamnose (0,1% Endkonzentration) induzierte KRX-Zellen, die den pET-20b(+) Vektor mit den genetischen Informationen für His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-EnGFP tragen.

3.6.2 Optimiertes all-Ala-BPTI₁₋₅₈

Im Folgenden wurde nach der Ursache, warum His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ nicht in den *E. coli*-Zellen exprimiert wird, sowie einer möglichen Lösung für dieses Problem gesucht.

3.6.2.1 CODONOPTIMIERUNG FÜR ALL-ALA-BPTI₁₋₅₈

Das genetische Material zur Generierung von His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ wurde charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass dieses fehlerfrei ist (vgl. Abschnitt 3.6.1.1). Da das *E. coli*-fremde Protein jedoch nicht in den Bakterien exprimiert wurde, musste die Ursache hierfür im Verlauf der Proteintranslation zu finden sein. Es war möglich, dass beim Design des all-Ala-BPTI₁₋₅₈-codierenden Oligonukleotids Alanin-Codons verwendet wurden, für deren Translation im Expressionsorganismus *E. coli* die entsprechenden tRNAs nicht in ausreichender Menge vorlagen. Dies wurde beim Entwurf des Oligonukleotids durch Analyse der *Codon Usage* bedacht und dabei wurden keine kritischen Indikatoren angezeigt. Dennoch wurde dies noch einmal an anderer Stelle überprüft. Mit Hilfe der Datenbank der Firma Mr. Gene GmbH, von welcher auch das Oligonukleotid selbst bezogen wurde, konnten die Codons der Sequenz des all-Ala-BPTI₁₋₅₈ für den *E. coli* K12-Stamm, von welchem sich die hier verwendeten KRX-Zellen als Derivat ableiten, optimiert werden, ohne die translatierten Aminosäuren durch die Verwendung synonyme Codons zu verändern. So wurde endgültig sicher gestellt, dass ausreichend passende tRNAs für die Proteinexpression in den KRX-Zellen vorhanden sind.

Das Ergebnis der Codonoptimierung ist in Abb. 3.6.3 auf Seite 68 dargestellt. Die Histogramme in den Teilabbildungen (A) und (B) zeigen den Prozentsatz der Sequenz-Codons vor und nach Codonoptimierung, die in eine bestimmte Qualitätskategorie für das entsprechende Expressionssystem fallen. Der Qualitätswert der für eine Aminosäure, z. B. Alanin, im gewünschten Expressionsorganismus, z. B. *E. coli*, am häufigsten vorkommenden tRNA wird als 100 definiert. Diese tRNA entspricht also dem „optimalen“ (Anti-)Codon für die betrachtete Aminosäure. Die „restlichen“ Codons für diese Aminosäure werden dementsprechend skaliert. Es ist zu beachten, dass auch eine optimierte Sequenz nicht ausschließlich aus „besten“ Codons besteht. In einigen Fällen ist die Verwendung synonyme Codons notwendig, um problematische Sequenzregionen, wie beispielsweise Restriktionsschnittstellen oder übermäßige Sequenzwiederholungen zu vermeiden. Nach der Codonoptimierung ist der Anteil an Codons, die, verglichen mit den nicht optimierten Codons, in eine bessere Qualitätskategorie fallen, deutlich erhöht. Die Teilabbildungen (C) und (D) bestätigen dies. Sie spiegeln den Codonqualitätswert im Bereich von 0 - 100 an der jeweiligen Aminosäureposition vor und nach der Codonoptimierung wider. Auch hier zeigt sich die klare Verbesserung der Codonqualität für den Wirt *E. coli*.

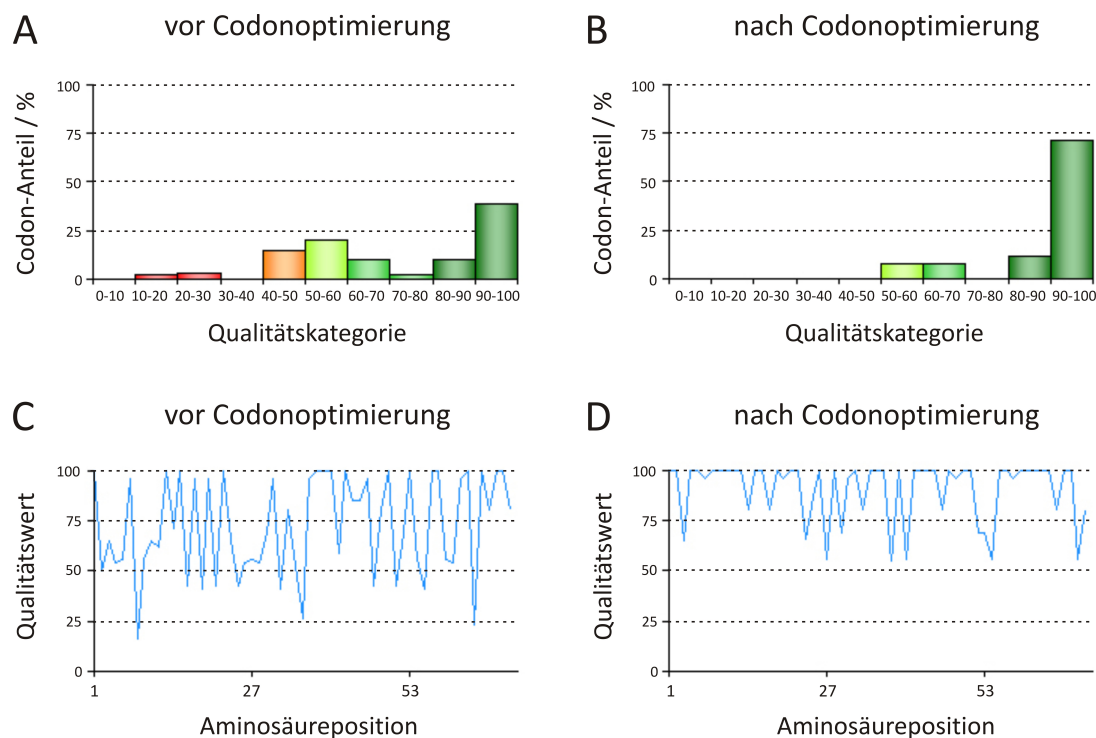


Abb. 3.6.3: Codonoptimierung für all-Ala-BPTI₁₋₅₈. (A) und (B): Histogramme der Qualitätskategorie der verwendeten Codons für das Modellsubstrat im Expressionssystem *E. coli* vor und nach Codonoptimierung. (C) und (D): Qualitätswerte der verwendeten Codons an der jeweiligen Aminosäureposition vor und nach Codonoptimierung. Alle Graphen wurden mit Hilfe der Optimierungsalgorithmen der Firma Mr. Gene GmbH, Regensburg auf www.mrgene.com erstellt.

Aus den durchgeführten Optimierungsprozessen ergaben sich die nachfolgend in Tab. 3.6.1 aufgeführten Codonänderungen zur Generierung synonyme, Alanin-codierender Codons in der optimierten Form des all-Ala-BPTI₁₋₅₈.

Tab. 3.6.1: Veränderungen in der Sequenz von BPTI, die zur Generierung von all-Ala-BPTI₁₋₅₈ sowie dessen optimierter Form für den Expressionswirt *E. coli* führen. Dargestellt sind die in der Wildtyp-Sequenz für Cystein codierenden Basentriplets an den jeweiligen Positionen und die veränderten, für Alanin codierenden Codons, die zur Generierung der beiden Mutanten verwendet wurden.

Position	ursprüngliches Codon	translatierte Aminosäure		mutiertes Codon		optimiertes Codon	translatierte Aminosäure
5	tgc	Cystein	⇒	gcc	⇒	gcc	Alanin
14	tgc	Cystein	⇒	gcc	⇒	gct	Alanin
30	tgc	Cystein	⇒	gcc	⇒	gca	Alanin
38	tgc	Cystein	⇒	gcc	⇒	gct	Alanin
51	tgc	Cystein	⇒	gcc	⇒	gca	Alanin
55	tgt	Cystein	⇒	gct	⇒	gca	Alanin

Das so für die Expression in *E. coli* Codon-optimierte all-Ala-BPTI₁₋₅₈ Oligonukleotid wurde ebenfalls von Mr. Gene GmbH, Regensburg bezogen.

3.6.2.2 CHARAKTERISIERUNG UND LIGATION DES OPTIMIERTEN ALL-ALA-BPTI₁₋₅₈-GENS

Das Codon-optimierte all-Ala-BPTI₁₋₅₈ Oligonukleotid wurde, genau wie das vorherige Oligonukleotid, von der Firma Mr. Gene GmbH im Vektor pMA geliefert und die zugehörige Vektorkarte entspricht der des nicht optimierten Modellsubstrats (vgl. Abb. A.1.3, Seite 156).

Wie bereits ausführlich in Abschnitt 3.6.1.1 beschrieben, wurde auch hier die Sequenz des optimierten Modellsubstrats von der Sequenz für eine Thrombinschnittstelle sowie den Sequenzen für die Restriktionsschnittstellen NdeI und XhoI umgeben. Ebenfalls lag eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker vor. Die für die Proteinexpression notwendige Promotorsequenz fehlte gleichermaßen. Daher wurde für die Proteingewinnung auch hier die Zielsequenz aus dem pMA-Vektor in den 6x His-Tag-tragenden Vektor pET-20b(+) umklontiert (vgl. Abschnitt 3.6.1.1, Seite 60).

Zu diesem Zweck wurde der ebenfalls in Pulverform gelieferte pMA-Vektor analog zur nicht optimierten Form des all-Ala-BPTI₁₋₅₈ gelöst und zur Plasmidvermehrung in XL1-Blue Zellen transformiert (vgl. Abschnitt 3.6.1.1, Seite 60). Aus den gewachsenen Übernachtskulturen der Transformanten konnte das vermehrte Plasmid isoliert werden.

Um nun das benötigte Gensegment der optimierten Form des all-Ala-BPTI₁₋₅₈ in den Expressionsvektor pET20b(+) zu ligieren, wurde dieses mit Hilfe der Restriktionsenzyme NdeI und XhoI aus dem vermehrten pMA-Vektor heraus verdaut (vgl. Abschnitt 5.3.4.4, Seite 126). Die verdaute DNA wurde mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit aufgereinigt und anschließend durch Elektrophorese auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt (vgl. Abschnitt 5.3.4.3, Seite 125 und Abschnitt 5.3.4.2, Seite 125). Das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese ist nachstehend in Abb. 3.6.4(A) dargestellt.

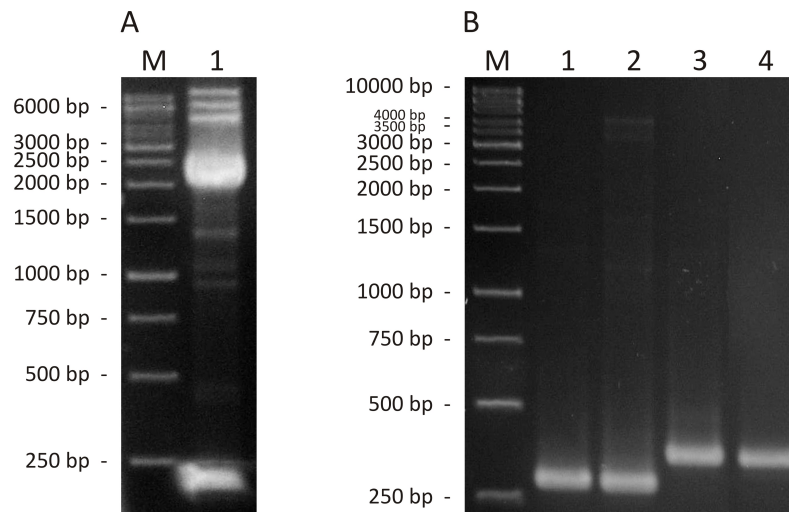


Abb. 3.6.4: 2%ige Agarosegele des Codon-optimierten all-Ala-BPTI₁₋₅₈; Bahn M: GeneRuler™1 kb DNA Ladder. **(A)** Restriktionsdoppeldigestion des Vektors pMA, der die optimierte Gensequenz des all-Ala-BPTI₁₋₅₈ trägt, mit den Enzymen NdeI (1 µl) und XhoI (1 µl). **(B)** Bahnen 1, 2: PCR des Vektors pET-20b(+) mit T7_{for}- und T7_{rev}-Primern; Bahnen 3, 4: Kolonie-PCR des über die Restriktionsschnittstellen NdeI und XhoI in den pET-20b(+) Vektor ligierten optimierten „all-Ala-BPTI₁₋₅₈“-Inserts mit T7_{for}- und T7_{rev}-Primern.

In Bahn 1 sind deutlich die beiden Banden des durch den Restriktionsdoppeldigestion mit NdeI und XhoI geschnittenen Vektors zu erkennen. Im unteren Teil der Bahn befindet sich bei etwa 200 bp das aus dem Vektor pMA ausgeschnittene Gensegment des optimierten all-Ala-BPTI₁₋₅₈. Die berechnete Größe für das so geschnittene Insert, welches neben den für die 58 Aminosäuren des optimierten all-Ala-BPTI₁₋₅₈ codierenden 174 Basen auch die genetische Information für die Thrombinschnittstelle sowie die NdeI- und XhoI-Restriktionsschnittstellen umfasst, beträgt 199 bp. Dies steht in sehr guter Übereinstimmung mit der detektierten Bandengröße. Die Gesamtgröße des unverdauten pMA-Vektors beläuft sich auf 2 574 bp. Abzüglich der 199 bp des NdeI-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-optimiert-Thrombinschnittstelle-XhoI-Gensegments beträgt die Größe des resultierenden zweiten Fragments 2 375 bp. Dieser Wert korrespondiert mit der in Bahn 1 auftretenden Bande zwischen 2 000 bp und 2 500 bp. Die drei schmalen Banden im oberen Bereich der Bahn lassen auf einen geringen Anteil an unverdauten Plasmiden schließen. Diese treten auf Agarosegelen als zirkulare, *coil*- und *supercoil*-Strukturen in Erscheinung.

Die untere Gelbande des benötigten optimierten „all-Ala-BPTI₁₋₅₈“-Inserts wurde aus dem Gel ausgeschnitten, wobei darauf geachtet wurde, eine UV-bedingte Schädigung der DNA möglichst zu vermeiden. Um die DNA aus der Agarose zu isolieren, wurde die ausgeschnittene Gelbande mittels NucleoSpin® Extract II Kit aufgereinigt (vgl. Abschnitt 5.3.4.3, Seite 125) und die DNA-Konzentration des Inserts bestimmt (vgl. Abschnitt 5.3.4.1, Seite 125). Die so präparierte DNA wurde nun zur Ligation mit dem pET-20b(+) Vektor verwendet. Zu diesem Zweck wurde der 3 716 bp große pET-20b(+) Vektor ebenfalls mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI geschnitten (vgl. Abschnitt 5.3.4.4, Seite 126). Die Aufreinigung des verdauten Vektors erfolgte

mit dem QIAquick® PCR Purification Kit und die Konzentration des geschnittenen Vektors wurde photometrisch bestimmt. Auf eine Dephosphorylierung der verbleibenden 3 586 bp großen Vektor-Sequenz wurde verzichtet und der geschnittene Vektor umgehend für die Ligation durch die T4 DNA-Ligase mit dem isolierten optimierten „all-Ala-BPTI₁₋₅₈“-Insert im Verhältnis 1:2 eingesetzt (vgl. Abschnitt 5.3.4.6, Seite 127). Der Ligationsansatz wurde in ultra-kompetente XL1-Blue Zellen transformiert, welche auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden von den gewachsenen Zellen isolierte Kolonien gepickt und diese einer Kolonie-PCR unterworfen (vgl. Abschnitt 5.3.2, Seite 123). Zur Kontrolle des Ligationsergebnisses wurde ebenfalls eine PCR mit dem nicht-ligierten Vektor pET-20b(+) durchgeführt. Für alle Reaktionen wurde das Primerpaar T7 forward/T7 reverse verwendet.

Die PCR-Ansätze wurden zur Charakterisierung vergleichend auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Abb. 3.6.4(B), Seite 70). Analog zu Abschnitt 3.6.1.1, sind auch hier deutlich die zu höherer Masse hin verschobenen Banden in den Bahnen 3 und 4 der Ligationsansätze bei ca. 370 bp zu erkennen. Im Vergleich hierzu treten die Bahnen 1 und 2 der nicht-ligierten Kontrollen bei etwa 300 bp in Erscheinung. Die berechnete Größe für das im pET-20b(+) Vektor zwischen den T7 forward-/T7 reverse-Primern einligierte optimierte NdeI-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-Thrombinschnittstelle-XhoI-Gensegment beträgt, genau wie im Fall des nicht optimierten Gens, 369 bp. Die kalkulierte Sequenzgröße zwischen den T7 forward-/T7 reverse-Primern des unligierten pET-20b(+) Vektors beläuft sich auf 300 bp. Dies steht in sehr guter Übereinstimmung mit den experimentellen Befunden. Somit wurde das optimierte „all-Ala-BPTI₁₋₅₈“-Insert erfolgreich in den pET-20b(+) Vektor ligiert.

Zur vollständigen Charakterisierung des neu generierten Vektors wurde dieses Resultat zusätzlich durch eine Sequenzanalyse abgeglichen. Hierzu wurde das ligierte Plasmid aus einer angelegten Übernachtskultur isoliert (vgl. Abschnitt 5.3.4.8, Seite 127) und mit den T7 forward-/T7 reverse-Primern sequenziert. Das Ergebnis dieser Sequenzanalyse ist nachfolgend in Abb. 3.6.5 dokumentiert.

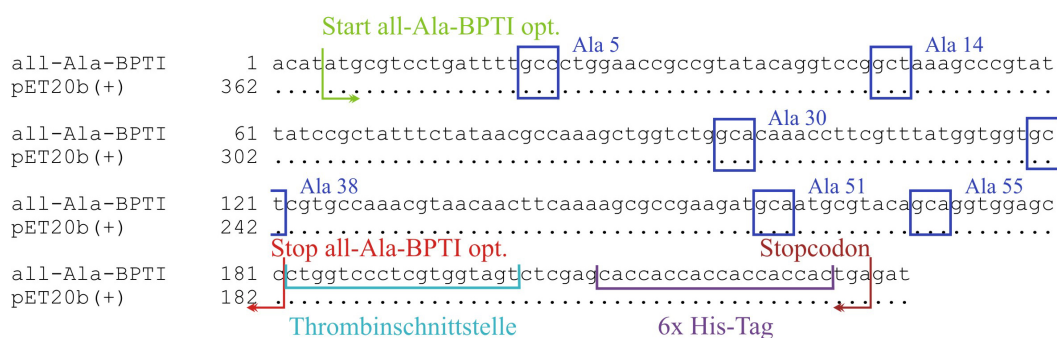


Abb. 3.6.5: Abgleich des Sequenzierergebnisses der Codon-optimierten Mutante His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ mit der kalkulierten Sequenz. Die eingefügten Mutationen sowie wichtige Charakteristika sind entsprechend markiert.

Das Sequenzierergebnis ist in der jeweils oberen Zeile und der Vergleich mit der korrespondierenden berechneten Sequenz in der darunter liegenden Zeile dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die korrekte Basensequenz des generierten Plasmids ohne unerwünschte Veränderungen, die von der berechneten Sequenz abweichen, erhalten wurde. Diese als fehlerfrei charakterisierte DNA für optimiertes His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ wurde anschließend zur Gewinnung des rekombinanten Proteins eingesetzt.

3.6.2.3 PROTEINEXPRESSION DES OPTIMIERTEN HIS₆^T-ALL-ALA-BPTI₁₋₅₈

Vor der Proteinexpression wurde der sequenzierte, für das optimierte His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ codierende pET-20b(+) Vektor aus den *E. coli* XL1-Blue Zellen isoliert und in ultra-kompetente KRX-Zellen transformiert (vgl. Abschnitt 5.3.4.8, Seite 127 und 5.3.4.7, Seite 127). Die Gründe für den Wechsel der Zelllinie zur verbesserten Proteingewinnung wurden bereits eingehend in den Abschnitten 3.1.4 und 3.2 dargelegt. Die transformierten KRX-Zellen wurden vermehrt und der Erfolg der Transformation durch Kontrollausstriche verifiziert. Aus den vermehrten Transformanten wurden ebenfalls Glycerinkulturen für optimiertes His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ angelegt (vgl. Abschnitt 5.4.3, Seite 129).

Zur Überprüfung, ob die optimierte Form des His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ in den *E. coli*-Zellen exprimiert wird, wurden kleine ampicillinhaltige LB-Bakterienkulturen aus derselben monoklonalen Kolonie mit einem Volumen von 1,5 ml angesetzt. In einer der Kulturen wurde die Proteinexpression durch Zugabe von Rhamnose induziert, in der anderen nicht. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert und beide Ansätze nach insgesamt 12 Stunden durch Zentrifugation geerntet. Der komplette Proteinhaushalt der Bakterien wurden mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. Abschnitt 5.2.2, Seite 120), wobei die resuspendierten Zellpellets durch Aufkochen im 4x SDS-Probenpuffer denaturiert wurden. Das Resultat ist in den Bahnen 1 und 2 der Abb. 3.6.6 gezeigt.

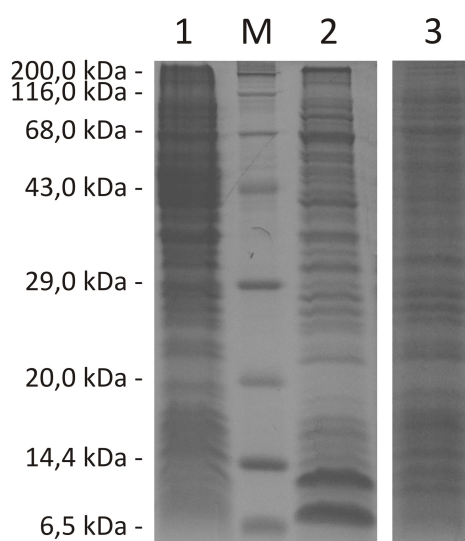


Abb. 3.6.6: 15%ige SDS-PAGE der Expressionskontrolle für optimiertes His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ durch Induktion mit 0,1% Endkonzentration Rhamnose. Bahn M: Protein Marker III; Bahn 1: Zellproteinhaushalt vor Induktion; Bahn 2: Zellproteinhaushalt 6,5 h nach Induktion (Bahnen 1 und 2: je 20 µl des in 150 µl 1x PBS-Puffer resuspendierten Zellpellets der jeweiligen Testkultur); Bahn 3: Von unlöslichen Zellbestandteilen gereinigtes Zellysate der *large-scale* Kultur nach Zellaufschluss mittels Ultraschall (1 µl).

In Bahn 1 der Abb. 3.6.6 ist der vollständige Proteinhaushalt der KRX-Zellen vor der Induktion mit Rhamnose zu sehen und in Bahn 2 nach Induktion. Im unteren Bereich von Bahn 2 ist, im Vergleich zu Bahn 1, deutlich das Auftreten zweier neuer Banden zu erkennen. Die untere der beiden Banden liegt bei einem Molekulargewicht leicht oberhalb von 6,5 kDa, was in der Größenordnung des Molekulargewichts des natürlich auftretenden Trypsininhibitors von 6,5 kDa liegt (Mannucci, 1998; Mahdy und Webster, 2004) (vgl. Abschnitt 1.3, Seite 14). Es ist allerdings zu beachten, dass es sich bei der im Rahmen dieser Arbeit exprimierten Form des für *E. coli* optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ um eine Proteinvariante mit einem carboxyterminalen 6x His-Tag handelt. Daher kommt es für dieses Protein zu einer Molekulargewichtserhöhung um ca. 1,5 kDa (vgl. hierzu auch Abschnitt 3.2.3 und Abb. 3.2.4). Die somit zu erwartende Proteinbande sollte also bei 8 kDa in der SDS-PAGE auftreten. Diese Größe stimmt gut mit der unteren der beiden detektierten Banden überein, die einem Protein der Masse von etwa 8 kDa entspricht. Diese Bande stellt somit ein erstes Indiz für eine erfolgreiche Expression von optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ in den KRX-Zellen dar. Die scheinbar erfolgreiche Expression mit dem Codon-optimierten Plasmid lässt darauf schließen, dass für die nicht optimierte Nukleotidsequenz tatsächlich zu wenige passende tRNAs für die Alanin-codierenden Codons zur Proteinexpression im Wirtsorganismus vorhanden waren.

Bei der zweiten Bande, die bei etwa 13 kDa auf dem SDS-Gel in Erscheinung tritt, wurde vermutet, dass es sich trotz der denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE um dimere Aggregate des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ handelt, da sich eine zweite Bande gleicher Größenordnung ebenfalls in der SDS-PAGE von kommerziell erworbenem nativem BPTI wieder fand (nicht dargestellt). Dies wurde nachfolgend in Abschnitt 3.6.2.4 genauer untersucht.

Der Vollständigkeit halber wurde auch das entsprechende Nährmedium der Bakterien-Testkultur nach Induktion der Proteinexpression analysiert, um abzuklären, ob optimiertes His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ in das Medium sezerniert wurde. Daher wurde der abzentrifugierte Überstand aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE analysiert (nicht dargestellt). Es fand sich keine Proteinbande von optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈. Somit konnte eine Sezernierung des Proteins ins Medium ausgeschlossen werden.

Zur Isolierung des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ wurden im Folgenden ampicillinhaltige Übernacht- und *large-scale* Kulturen aus den zuvor angefertigten Glycerinkulturen angelegt (vgl. Abschnitt 5.4.5, Seite 132). Nach Induktion mit Rhamnose und Eintritt in die stationäre Phase bei einer OD₆₀₀ von 2,3 wurde das Zellwachstum durch Inkubation der *large-scale* Kulturen auf Eis gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Die resultierenden Zellpellets wurden zur Entfernung von Nährmediumrückständen gewaschen, erneut abzentrifugiert und in Resuspendierungspuffer aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. Abschnitt 5.4.5.1, Seite 132) und Zelltrümmer sowie *inclusion bodies* durch Zentrifugation der lysierten Zellen von den löslichen Zellproteinen abgetrennt. Umgerechnet ergaben sich hierbei ca. 46% an unlöslichen Zellbestandteilen, was einen vergleichbaren Wert

zum Anteil unlöslichen Zellmaterials im Zug der Aufreinigung von SecB aus dem gleichen Bakterienstamm darstellt (vgl. Abschnitt 3.2.1). Der lösliche Überstand wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

Das Resultat ist in Bahn 3 der Abb. 3.6.6 auf Seite 72 zu sehen. Das Zellysate enthält den löslichen Proteinanteil der *E. coli*-Zellen, weist jedoch nicht die induzierten Banden von überexprimiertem optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ im Bereich von ca. 8 kDa auf, wie es in Bahn 2 der Fall ist. Das *E. coli*-fremde Zielprotein wurde daher vermutlich in *inclusion bodies* eingeschlossen und befand sich nach der Zellyse zusammen mit den unlöslichen Zelltrümmern im abzentrifugierten Pellet.

Das Lysat der löslichen Zellproteine wurde verworfen und zum Aufschluss der *inclusion bodies* wurde das Pellet der Zelltrümmer in Guanidin-Hydrochlorid-haltigem Denaturierungspuffer resuspendiert und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert (vgl. Abschnitt 5.4.5.2, Seite 132). Nach beendeter Inkubation war die zuvor trübe Suspension klar geworden. Um verbliebene Zelltrümmer und Schwebstoffe von den sich nun im Überstand befindenden Proteinen der aufgeschlossenen *inclusion bodies* abzutrennen, wurde der Ansatz abschließend zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde verworfen und der Proteingehalt des klaren Lysats mittels BCA-Test bestimmt. Es ergab sich eine Gesamtproteinmenge von 455 mg aus den aus drei Litern Kultursuspension isolierten und aufgeschlossenen *inclusion bodies*.

3.6.2.4 AUFREINIGUNG DES OPTIMIERTEN HIS₆^T-ALL-ALA-BPTI₁₋₅₈

Das Lysat der aufgeschlossenen *inclusion bodies* wurde anschließend ohne weitere Aufarbeitung für die Nickel-Affinitätschromatographie eingesetzt (vgl. Abschnitt 5.4.5.3, Seite 132), wobei das 6x His-Tag gelabelte Protein durch Koordination an das Säulenmaterial aus dem Proteingemisch isoliert werden sollte. Die hierbei auftretenden Prozesse wurden bereits detailliert unter Abschnitt 3.2.2 erörtert. Während der Inkubation des Lysats mit Nickel-NTA-Agarose werden die an den optimierten Trypsininhibitor fusionierten Polyhistidinsequenzen mit hoher Affinität von den zweiwertigen Nickel-Kationen komplexiert, was die chromatographische Aufreinigung des Proteins gestattet. Hierbei kam es durch die Koordination der Proteine zu einer charakteristischen Gelbfärbung des Säulenmaterials. Abweichend von der Aufreinigung der SecB-Proteine erfolgte bei der Isolierung des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ ein doppelter Waschschrift mit erhöhten Imidazol-Konzentrationen. Die Waschschriffe erfolgten jeweils zweimal mit 4 ml Waschpuffer, der eine 50 mM Imidazol-Konzentration enthielt und zweimal mit 4 ml Waschpuffer einer 100 mM Imidazol-Konzentration. Dies wurde durchgeführt, um einerseits hartnäckige „Verunreinigungen“ durch unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen und andererseits eine übermäßige, verfrühte Elution des Zielproteins durch eine zu hohe Imidazol-Konzentration zu vermeiden, da Imidazol mit den Histidin-Resten um die Bindungsplätze des Säulenmaterials

konkurriert und diese verdrängt. Die Elution des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ erfolgte achtmal mit je 1 ml Elutionspuffer, der eine 500 mM Imidazol-Konzentration enthielt. Die dabei auftretende Entfärbung des im proteinbeladenen Zustand gelblich gefärbten Säulenmaterials zu seiner ursprünglichen blauen Farbe belegte das erfolgreiche Abdissoziieren der Polyhistidine des Proteins.

Das Elutionsprofil der säulenchromatographischen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE untersucht (vgl. Abb. 3.6.7(A), Seite 76). Die Bahnen 1 und 2 zeigen die Waschfraktionen mit 50 mM Imidazol Waschpuffer und in den Bahnen 3 und 4 sind die Proben der Waschschriffe mit 100 mM Imidazol Waschpuffer aufgetragen. Von den acht säulenchromatographisch erhaltenen Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol Elutionspuffer wurden die Proben der ersten fünf Fraktionen in den Bahnen 5 - 9 aufgetragen. Die restlichen drei untersuchten Elutionsfraktionen zeigten das gleiche Ergebnis wie die bereits abgebildeten Fraktionen und sind daher nicht dargestellt. Aufgrund der hohen Konzentration an Guanidin-Hydrochlorid, die zum Aufschluss der *inclusion bodies* aus dem Denaturierungspuffer stammte, wurde keine Probe des säulenchromatographischen Durchlaufs auf dem Gel untersucht, da diese bereits in den Geltaschen aggregierte und hier auf eine Dialyse dieser Fraktion verzichtet wurde.

In Abb. 3.6.7(A) ist in den Fraktionen der Waschschriffe (50 mM Imidazol) deutlich erkennbar, dass der Großteil der unspezifisch mit dem Säulenmaterial in Wechselwirkung getretenen Proteine im zweiten Schritt eluierte. Dies ist in Bahn 2 aufgetragen. Im unteren Teil der Bahn ist jedoch bereits ein kleiner Anteil an Proteinen, die mit etwa 8 kDa in derselben Größenordnung wie das zu isolierende optimierte His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ liegen, zu erkennen. Hierbei könnte es sich um eine verfrühte Elution des Zielproteins handeln. Proben der weiteren Waschschriffe (100 mM Imidazol) in den Bahnen 3 und 4 zeigten dahingegen lediglich einen geringen Abgang weiterer Verunreinigungen. Im Vergleich zu Bahn 2 ist hier ein vernachlässigbar kleiner Anteil an Proteinen der Größe 8 kDa an entsprechender Stelle erkennbar.

Die Untersuchung der Elutionsfraktionen (500 mM Imidazol) in den Bahnen 5 - 9 zeigte, dass in allen Bahnen noch leichte, höhermolekulare Verunreinigungen vorhanden waren. Im unteren Bereich aller Bahnen treten deutlich zwei spezifische Banden in der Größenordnung von 8 kDa bzw. 13 kDa auf. Dieses Doppelbandenmuster wurde bereits in Bahn 2 von Abb. 3.6.6 beobachtet, welche die gezielte Überexpression des Zielproteins nach Induktion der Proteinexpression darstellt. Wie an dieser Stelle zuvor bereits erörtert, kann es sich somit bei der 8 kDa Bande auf dem vorliegenden Gel in Abb. 3.6.7(A) um das gesuchte optimierte His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ handeln. Die auf dem SDS-Gel in den Bahnen 7 und 8 aufgetragenen Elutionsfraktionen 3 und 4 stellen gleichzeitig die Hauptelutionsfraktionen der Proteine dar.

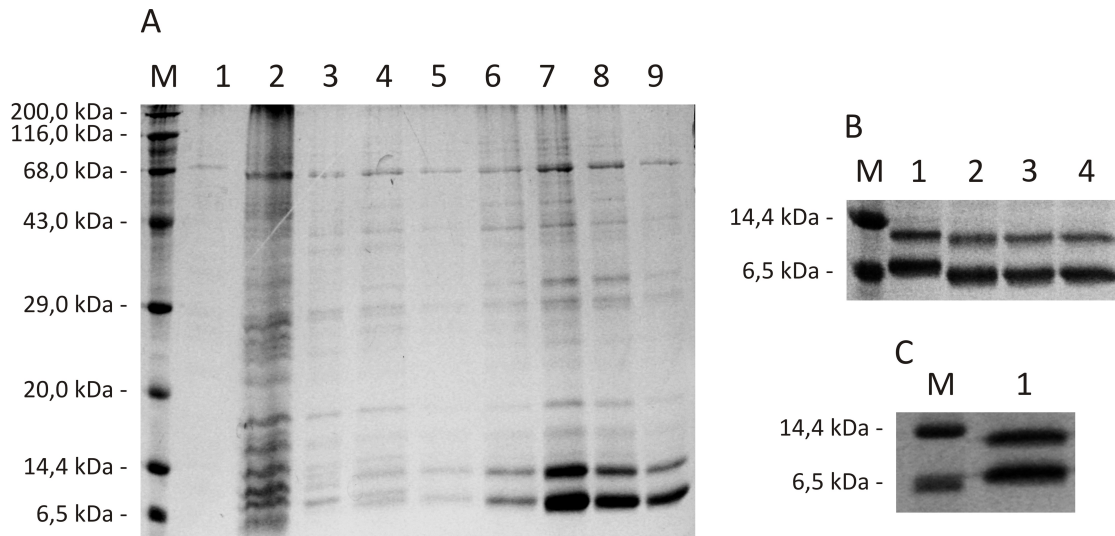


Abb. 3.6.7: 15%ige SDS-PAGE der Isolierung und Aufreinigung des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈; Bahn M: Protein Marker III. (A) Nickel-Affinitätschromatographie von optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈. Bahnen 1, 2: Waschfraktionen 50 mM Imidazol (je 10 µl); Bahnen 3, 4: Waschfraktionen 100 mM Imidazol (je 10 µl); Bahnen 5 - 9: Elutionsfraktionen 500 mM Imidazol (je 10 µl). (B) Harnstoff-Denaturierung des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈. Bahn 1: Harnstoff-freie Probe (7 µl); Bahn 2: 2 M Endkonzentration Harnstoff (7 µl); Bahn 3: 4 M Endkonzentration Harnstoff (7 µl); Bahn 4: 6 M Endkonzentration Harnstoff (7 µl). (C) Bahn 1: Optimiertes His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ nach Pufferwechsel, Lyophilisieren und Resolvatisierung (5 µg).

Um nun aufzuklären, ob es sich bei der 13 kDa Bande um Aggregate des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ handelt, wurden Proben der Hauptelutionsfraktion 3 aus der Nickel-Affinitätschromatographie mit unterschiedlichen Endkonzentrationen an Harnstoff aufgeköcht. Falls es sich bei der 13 kDa Bande um Aggregate des Zielproteins handelt, so sollten diese nach dieser Behandlung zumindest zum Teil aufgebrochen worden sein und sich der Anteil der Gelbande im Bereich 13 kDa verringern oder ganz verschwinden, so dass die Bande des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ bei 8 kDa in einem gleichermaßen vergrößerten Anteil vorhanden wäre. Diese Vermutung konnte durch die SDS-PAGE Analyse in Abb. 3.6.7(B), die das Resultat dieser Untersuchung repräsentiert, nicht bestätigt werden. In Bahn 1 ist eine Probe der Hauptelutionsfraktion 3 der Nickel-Affinitätschromatographie ohne Zusatz von Harnstoff aufgetragen. Die Bahnen 2 - 4 zeigen Proben derselben Elutionsfraktion nach Inkubation mit aufsteigenden Endkonzentrationen von 2 M, 4 M und 6 M Harnstoff. Es treten kaum Änderungen zwischen den Banden der Harnstoff-freien Probe und den Proben mit Harnstoff auf, welche die Vermutung einer gleichzeitigen Intensitätsabnahme der oberen Bande in Verbindung mit einer Intensitätszunahme der unteren Bande bestätigen könnten. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der 13 kDa Bande um ein zweites überexprimiertes Protein handelt, dessen Identität es noch aufzuklären gilt.

Wie in den Bahnen 5 - 9 der Elutionsfraktionen aus der Nickel-Affinitätschromatographie in Abb. 3.6.7(A) zu sehen war, lagen neben der noch unidentifizierten 13 kDa Bande noch weitere

leichte Verunreinigungen im höhermolekularen Bereich vor, die gleichzeitig mit den optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-Proteinen vom Säulenmaterial dissoziierten. Daher wurde der Versuch unternommen, diese durch Ultrazentrifugation mit Membranen unterschiedlicher Ausschlussgrößen vom 8 kDa schweren Zielprotein zu separieren. Zu diesem Zweck wurden alle acht Elutionsfraktionen vereinigt. Durch Waschen mit Phenylmethansulfonylfluorid(PMSF)-haltigem Dialysepuffer war es so möglich, einen Teil der höhermolekularen Verunreinigungen abzutrennen. Das 8 kDa kleine optimierte His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ konnte verdünnt im Filtrat zurückgewonnen werden und wurde aufkonzentriert. Jedoch konnte das zweite überexprimierte Protein der 13 kDa Bande auf diese Weise nicht abgetrennt werden.

SDS-PAGE Untersuchungen, die zuvor im Zug der chemischen Modifizierung des kommerziell erworbenen nativen Modellsubstrats angefertigt wurden (vgl. Abschnitt 3.4.1, Seite 50), hatten gezeigt, dass in der nicht-modifizierten Variante des nativen BPTI ebenfalls eine zweite Proteinbande im Bereich von 13 kDa auf dem SDS-Gel auftrat. Nach der Carboxyamidomethylierung konnte diese nicht mehr detektiert werden (nicht dargestellt). Es wurde also vermutet, dass das Fremdprotein durch den Aufreinigungsschritt mittels PD-10 Säule im Verlauf der Carboxyamidomethylierung aus der Lösung entfernt wurde. Daher wurde an dieser Stelle untersucht, ob das unbekannte Protein der 13 kDa Bande ebenfalls durch eine Aufreinigung mittels PD-10 Säule von der 8 kDa Bande des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ abgetrennt werden kann. In diesem säulenchromatographischen Schritt wurde so gleichzeitig auch die imidazolhaltige Pufferlösung der Elutionsfraktionen aus der Nickel-Affinitätschromatographie gegen den flüchtigeren Triethylammonium-Hydrogencarbonatpuffer ausgetauscht. Dieser Pufferwechsel ermöglichte es, die proteinhaltige Lösung über Nacht zu lyophilisieren (vgl. Abschnitt 5.4.5.4, Seite 133) und somit aufzukonzentrieren. Es wurde ein weißer, pudriger Feststoff erhalten, der zur weiteren Verwendung in definierten Volumina in Lösung gebracht wurde.

Abb. 3.6.7(C) veranschaulicht das Resultat der SDS-PAGE Analyse des umgepufferten, lyophilisierten und resolvatisierten optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ in Bahn 1. Das unbekannte Protein konnte auch durch die Aufreinigung mittels PD-10 Säule nicht vom Zielprotein abgetrennt werden. Die etwa 13 kDa große Bande oberhalb der 8 kDa Bande des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ ist weiterhin auf dem Gel vorhanden und es zeigte sich keine Veränderung im Bandenmuster.

Insgesamt konnten umgerechnet etwa 44,5 mg optimiertes His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-haltiger Feststoff aus den aus drei Litern Kulturmedium gewonnenen *inclusion bodies* isoliert werden. Dies stellt einen rund 10%igen Anteil an der in den *inclusion bodies* enthaltenen Gesamtproteinmenge dar.

Die Reinheit der SDS-Gelbanden der in diesem Abschnitt beschriebenen Aufreinigungsschritte wurde densitometrisch überwacht. Die erste Analyse wurde an den noch nicht durch Ultrazentrifugation gereinigten Gelbanden der Hauptelutionsfraktion der Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt. Hierbei ergab sich eine Reinheit von 32% für die 8 kDa Bande des optimierten

His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ und 18% für die darüberliegende Bande bei etwa 13 kDa.

Nach Umpuffern und Lyophilisieren wurde die Reinheit der Banden der resolvierten Proteine abschließend im Densitometer bestimmt. Es ergab sich ein 42%iger Anteil der optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-Bande der Größe 8 kDa, was eine 10%ige Steigerung im Vergleich zur Reinheit der Bande nach der Nickel-Affinitätschromatographie darstellt. Allerdings stieg der prozentuale Anteil der 13 kDa Bande ebenfalls auf 32% an. Zusammengenommen ergab sich nach den Aufreinigungsschritten somit eine deutliche Verbesserung der gesamten Reinheit der Proteinlösung um 24%, in der das optimierte His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ und das unbekannte 13 kDa Protein zusammen den Hauptanteil mit 74% ausmachen.

Aufgrund der relativ geringen Ausbeuten an benötigtem optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ wurde auf eine Thrombinspaltung zur Entfernung des 6x His-Tags an dieser Stelle verzichtet, um weitere Ausbeuteverluste zu vermeiden. Die natürlichen Substrate der SecB-abhängigen Translokation sind *precursor* Proteine, die spezielle Signalsequenzen aufweisen, um von den Chaperonen erkannt zu werden. Diese Signalsequenzen befinden sich im ausgereiften Teil der Präproteine und in einer kurzen, N-terminalen Verlängerung (Fekkes und Driessen, 1999). Da der 6x His-Tag des hier verwendeten Modellsubstrats C-terminal mit dem rekombinanten Trypsininhibitor fusioniert ist, sollte dieser die Erkennung und Bindung des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ nicht beeinflussen und kann am Protein belassen werden.

Um die Identität des zweiten überexprimierten Proteins in der Probe aufzuklären und dieses zu charakterisieren wurde nachfolgend sowohl die Bande des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ als auch die unbekannte 13 kDa Bande mittels *Electrospray Ionization* (ESI) und anschließender Tandem-Massenspektrometrie untersucht.

Im Anschluss daran kann bei bekannter Identität der 13 kDa Bande geklärt werden, ob sich das Fremdprotein störend auf die Komplexbildung des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ mit dem Chaperon SecB auswirkt.

3.6.3 Nachweis von *E. coli* optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ mittels ESI-MS/MS

Zur Identifizierung des unbekanntes Proteins, welches als Verunreinigung bei etwa 13 kDa in den SDS-PAGE Analysen des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ auftrat, wurden die Banden des SDS-Gels aus Bahn 1 der Abb. 3.6.7(C), Seite 76 mittels *Electrospray Ionization* und anschließender Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) untersucht. Diese Messungen wurden in der Arbeitsgruppe Tierphysiologie des Fachbereichs Biologie der TU Kaiserslautern durchgeführt. Dazu wurden beide Gelbanden separat aus dem Gel ausgeschnitten und über Nacht tryptisch durch einen In-Gel Verdau für die ESI-MS/MS Untersuchung vorbereitet (vgl. Abschnitt 5.7.2.1, Seite 136). Dabei spaltet Trypsin Peptidbindungen nach den Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R). Im Anschluss daran wurden die Proben wiederholt durch Inkubation im Ultraschallbad

in Ameisensäure extrahiert. Die Trennung und Analyse der tryptisch verdauten Peptide wurde durch eine Kombination aus *Nanoscale Reversed-Phase* Flüssigchromatographie, die die Protein-Fragmente aufkonzentriert, reinigt und durch einen Puffer-Gradienten auftrennt, und eine anschließende Analyse mittels ESI-MS realisiert (vgl. Abschnitt 5.7.2.2, Seite 137).

Die Datenanalyse umfasste die drei am häufigsten vorkommenden Ionen jedes Durchlaufs. Die Rohdaten wurden mit MassLynx 4.0 gesammelt und mit ProteinLynx 2.1 verarbeitet. Die resultierenden Daten wurden durch Datenbanksuche gegen die *SwissProt Database* abgeglichen.

Abb. 3.6.8, Seite 79 zeigt schematisch mögliche Bindungsbruchstellen und die entsprechende Nomenklatur der Peptid-Fragmentierung. Die dabei auftretenden Fragmentierungen sind in der Abbildung farblich markiert. Sie treten vor allem zwischen Bindungen des Peptidrückgrats auf (blaue Markierungen) und nur in seltenen Fällen im Bereich der Seitenketten (grüne Markierungen). Verbleiben die Ladungen am C-terminalen Teil des Peptids, so spricht man je nach Bruchstelle von x-, y- oder z-Fragment-Ionen. Bei den N-terminalen Äquivalenten handelt es sich entsprechend um a-, b- oder c-Fragment-Ionen. Die Indizierung bezeichnet jeweils die Position des Aminosäurerests, nach dem die Spaltung erfolgt. Hauptsächlich treten die Brüche an den Peptidbindungen durch Spaltung der Bindungen zwischen Carbonylkohlenstoff und Amidstickstoff auf, wodurch es primär zur Ausbildung von b- und y-Ionenserien kommt (Roepstorff und Fohlman, 1984).

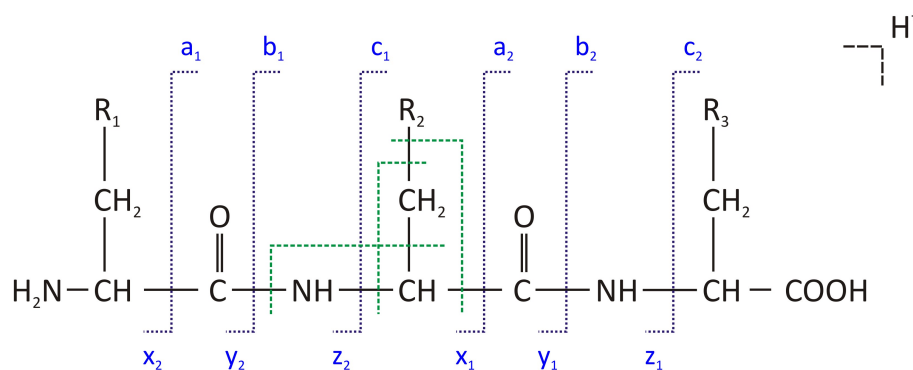


Abb. 3.6.8: ESI-MS/MS Nomenklatur der Peptid-Fragmentierung. Schematische Bildung von Fragment-Ionen am Beispiel eines protonierten Tripeptids. In Anlehnung an C. Schmelzer, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie.

3.6.3.1 CHARAKTERISIERUNG DER 8 kDA PROTEINBANDE

Mit Hilfe der ESI-MS/MS Analyse wurde für die 8 kDa SDS-Gelbande ein Peptid in mehreren Messungen wiederholt und eindeutig mit einem Score-Wert von 74 identifiziert. Hierbei handelte es sich um das Peptid-Fragment Ala-Gly-Leu-Ala-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Ala-Arg, dessen korrespondierendes ESI-MS/MS Spektrum nachfolgend in Abb. 3.6.9 dargestellt ist.

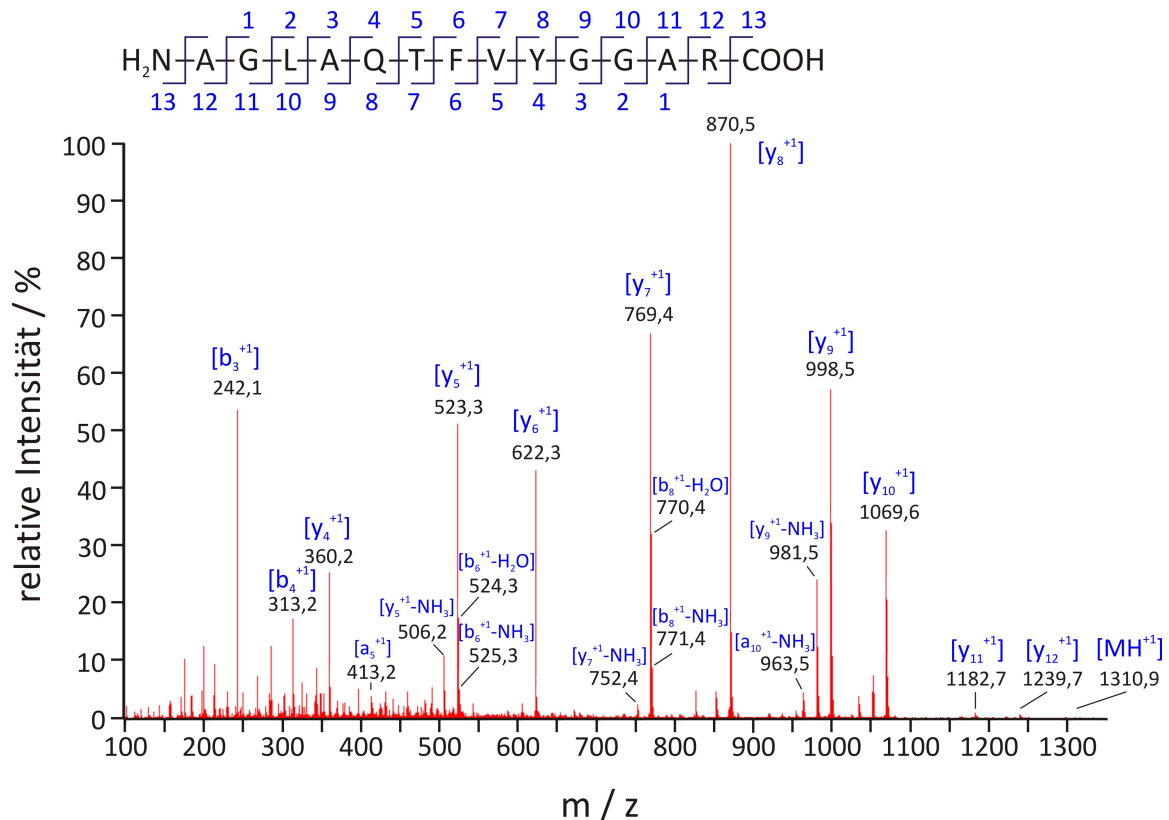


Abb. 3.6.9: ESI-MS/MS Spektrum eines Peptid-Fragments des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈.

Das Fragmentierungs-Spektrum repräsentiert das Ergebnis einer zweifach positiv geladenen Fragmentmasse von umgerechnet 655,9 Da, welche während der Aufzeichnung den intensivsten Wert mit $2,05 \cdot 10^4$ counts aufwies. Dieser wurde als Bezugspunkt zur Intensitäts-Normierung der Peptid-Fragmente als 100% festgelegt. Es wurden neun Spektren aufsummiert und Baseline-korrigiert. Die Zuordnung und Identifizierung der jeweiligen Fragment-Ionen wurde mit Hilfe eines theoretischen Verdauers der Peptid-Fragmentsequenz mit der Datenbank *Protein Prospector; MS-Product* (www.prospector.ucsf.edu) vorgenommen und ist an den entsprechenden Peaks im MS/MS-Spektrum vermerkt. Somit konnte die Sequenz des Fragments Ala-Gly-Leu-Ala-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Ala-Arg (AGLAQTTFVYGGAR) verifiziert werden.

Ferner wurden in diesen Untersuchungen vier weitere, einfach positiv geladene Peptide detektiert und gleichermaßen identifiziert. Die Sequenzen der Peptide mit den nachfolgend höchsten Score-Werten lauten Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Ala-Lys-Ala (RYFYNAKA; Fragmentmasse: 805,4 Da; Score-Wert: 36) und Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Ala-Met-Arg-Thr (KSAEDAMRT; Fragmentmasse: 779,4 Da; Score-Wert: 34).

Die drei Peptid-Sequenzen mit den höchsten Score-Werten stimmen mit den farblich hervorgehobenen Abschnitten der Sequenz des optimierten all-Ala-BPTI₁₋₅₈ überein (vgl. Abb. 3.6.10). Diese drei charakterisierten Peptid-Fragmente machen bereits einen 50%igen Anteil der Gesamtse-

quenz des all-Ala-BPTI₁₋₅₈ aus. In den Messungen wurden keine Fragmente des Polyhistidin-Tags nachgewiesen, daher wurde dieser in der abgebildeten Sequenz nicht berücksichtigt.



Abb. 3.6.10: Übereinstimmungen der durch ESI-MS/MS identifizierte Peptid-Fragmente (grün) mit der Aminosäuresequenz des optimierten all-Ala-BPTI₁₋₅₈.

Insgesamt gelang die Identifizierung des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ mit einem Score-Wert von 149. Die Datenbank wurde zu diesem Zweck so modifiziert, dass die im natürlichen BPTI vorkommenden Cysteine durch Alanine substituiert wurden. Somit konnte nun die Identität des 8 kDa Proteins auf dem SDS-Gel (vgl. Abb. 3.6.7(C), Seite 76) eindeutig geklärt und die erfolgreiche Expression des rekombinanten Trypsininhibitors His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ in den KRX-Zellen zweifelsfrei bestätigt werden.

3.6.3.2 CHARAKTERISIERUNG DER 13 kDa PROTEINBANDE

Die analoge Analyse der unbekannt 13 kDa Proteinbande ergab, dass in dieser Probe ebenfalls Spuren des optimierten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ enthalten waren, welche jedoch als Verunreinigungen aus dem vorherigen Chromatographiedurchlauf interpretiert werden konnten.

Der weitere Datenbankabgleich ergab positive Zuweisungen für mehrere Peptid-Fragmente zweier möglicher Proteine. Zum einen wurden vier Peptide, welche dem ribosomalen Protein S19 mit einem Gesamt-Score-Wert von 171 zugeordnet werden konnten, identifiziert und zum anderen fand sich ein Peptid, welches mit einem Gesamt-Score-Wert von 90 als der ATP-Synthase ϵ -Kette (F₁-Bereich) zugehörig zugeordnet werden konnte.

Für das erste mögliche Protein, das ribosomale Protein S19, ist in Abb. 3.6.11 exemplarisch das ESI-MS/MS Spektrum einer dreifach positiv geladenen Fragmentmasse von umgerechnet 575,0 Da dargestellt, welche mit einem Score-Wert von 70 nachgewiesen und dem Peptid QHV-PVFVTDEMVGHK zugeordnet werden konnte. Es fand sich ebenfalls das dreifach positiv geladene Fragment AVESGDKKPLR mit einem Score-Werte von 62 und einer umgerechneten Fragmentmasse von 400,6 Da, welches neben zwei weiteren Peptiden ebenfalls dem ribosomalen Protein S19 zugewiesen werden konnte. Das ribosomale Protein S19 weist eine molekulare Masse von 10,3 kDa auf und ist somit allerdings kleiner als die auf dem SDS-Gel detektierte Proteingröße.

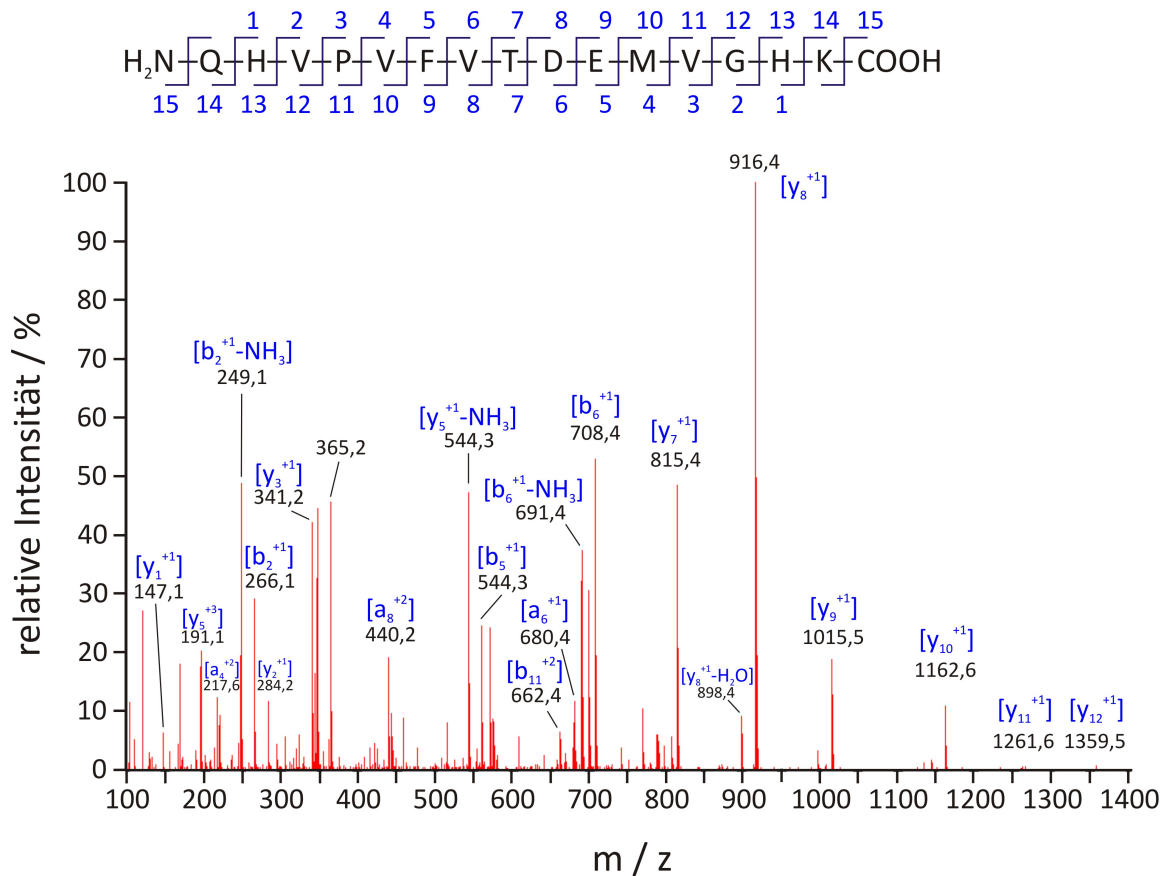


Abb. 3.6.11: ESI-MS/MS Spektrum des Peptid-Fragments QHVPVFVTDEMVGHK aus der 13 kDa Proteinbande.

Für die zweite mögliche Identifizierung ist in Abb. 3.6.12 das ESI-MS/MS Spektrum der Fragmentmasse von 755,4 Da illustriert. Dieses Fragment trat in vierfach positiv geladener Form auf und wurde mit einem Score-Wert von 90 als ein aus der ATP-Synthase ϵ -Kette stammendes Peptid-Fragment mit der Sequenz IQVTGSEGELGIYPGHAPLLTAIKPGMIR identifiziert. Jedoch konnte in diesem Fall keine komplette y-Kette zugeordnet werden. Das zugehörige Molekulargewicht für die ATP-Synthase ϵ -Kette beträgt 14,9 kDa und liegt damit leicht oberhalb der experimentell detektierten Größe der unbekanntes Bande im SDS-Gel von ca. 13 kDa.

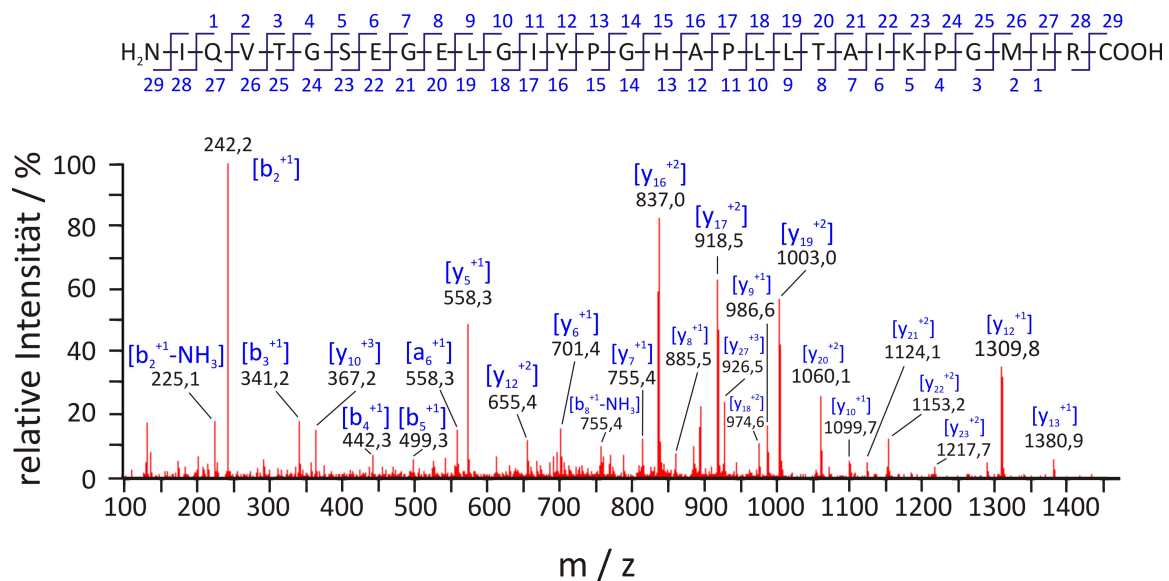


Abb. 3.6.12: ESI-MS/MS Spektrum des Peptid-Fragments IQVTGSEGLGIYPGHAPLLTAIKPGMIR aus der 13 kDa Proteinbande.

Beide Proteine sind im *E. coli*-Stamm K12 vertreten, allerdings weisen beide keine histidinreichen Sequenzen auf, was die beobachtete selektive Wechselwirkung mit der Nickel-NTA-Matrix hinreichend erklären würde. Auch kann die gezielte Überexpression der Proteine durch die Induktion mit Rhamnose nicht belegt werden.

Neben Fragmenten dieser zwei möglichen Proteine wurde wiederholt das zweifach positiv geladene Peptid KEAELAAATAEQ (umgerechnete Fragmentmasse: 616,3 Da; Score-Wert: 129) in der Probe detektiert. Die möglichen Proteinzugehörigkeiten, wie unter anderem beispielsweise dem Minor Capsid Protein 10B oder einem Hexahistidin-Peptid des Expressionsvektors pViet, ergaben jedoch keine Übereinstimmung mit der bestimmten Bandengröße oder dem *E. coli*-Stamm K12.

Die unbekannte 13 kDa Bande im SDS-Gel konnte somit nicht eindeutig identifiziert werden.

3.7 Simulation der SecB-Struktur mit Hilfe des *Molecular Modeling*

Zur theoretischen Bestimmung der Abstände zwischen den Nitroxid-Radikalen der MTS-gelabelten Cysteine von jeder der vier identischen Untereinheiten des SecB-Tetramers wurden die räumlichen Proteinstrukturen für beide Mutanten, SecB C97 und SecB E90C, im substratfreien Zustand mittels *Molecular Modeling* kalkuliert und dargestellt.

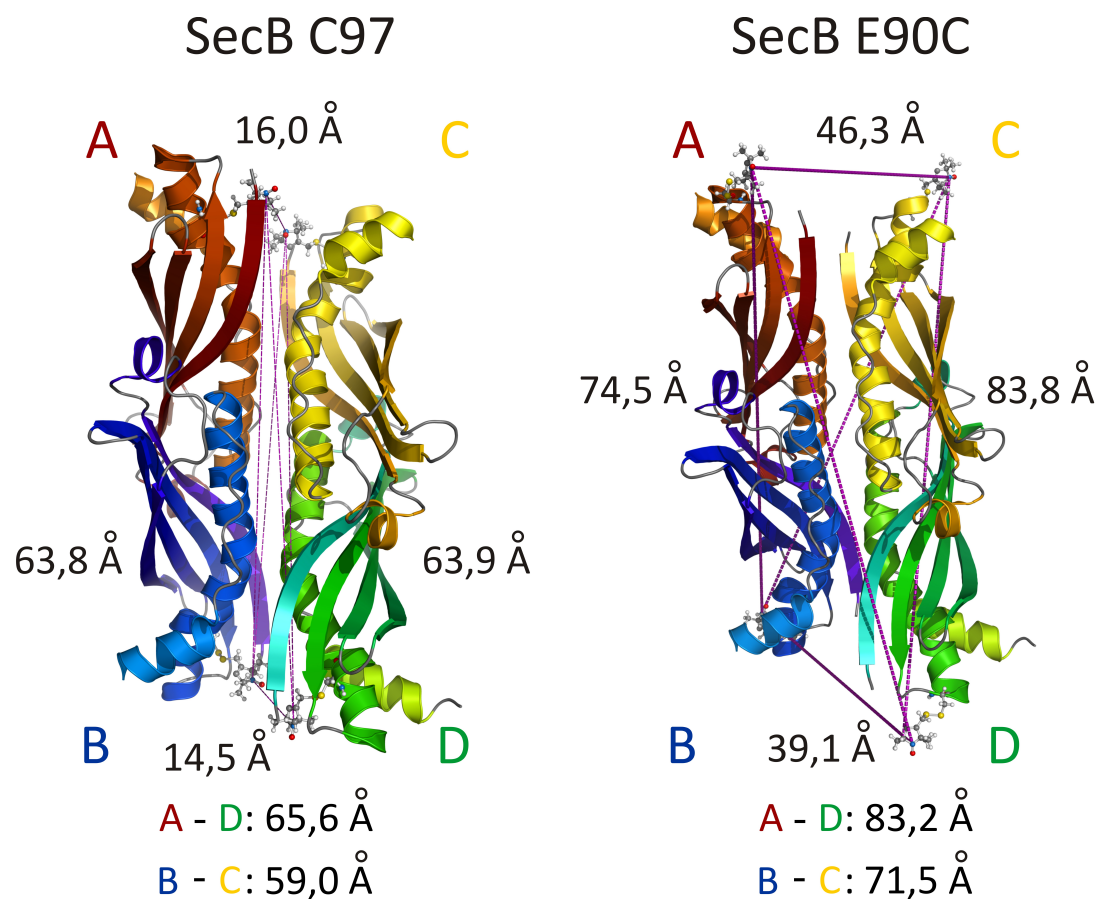


Abb. 3.7.1: *Molecular Modeling*. Im linken Teil der Abbildung ist die Mutante SecB C97 und im rechten Teil die Mutante SecB E90C dargestellt. Die jeweiligen Untereinheiten sind farblich gekennzeichnet. Die mittels molekulardynamischer Rechnungen ermittelten Abstände zwischen den Nitroxid-Radikalen (NO[•]) der MTS-gelabelten Cysteine sind ebenfalls angegeben.

Der Datensatz der Kristallstruktur von *E. coli* SecB-Wildtyp (PDB Code: 1QYN, RCSB PDB) (Dekker *et al.*, 2003) wurde hinsichtlich der entsprechenden Modifizierungen mit Hilfe des Programms Discovery Studio 2.5 (Accelrys) angepasst. Für die Mutante SecB C97 wurden in jeder Untereinheit des Homotetramers die Cysteine an den Positionen 76, 102 und 113 durch Alanine ersetzt und ein MTS-Label an jedes der vier im Protein verbleibenden Cysteine an den Positionen 97 eingebaut. Das analoge Vorgehen wurde auf die Mutante SecB E90C angewandt. Die Cysteine an den Positionen 97 und 102 an jeder der vier Untereinheiten wurden durch Alanine ersetzt und die Glutaminsäure an den 90er Positionen wurde jeweils gegen ein MTS-gelabeltes Cystein

ausgetauscht.

Eine energiearme Konformation der Spinlabel innerhalb der Proteine wurde durch Energieminimierung mit Hilfe von molekulardynamischen (MD) Rechnungen ermittelt. Dazu wurde das Kraftfeld charm22 der Kraftfeld-Maschine CHARMM mit den Minimierungsalgorithmen *Steepest Descents* und *Conjugated Gradient* angewandt. Mittels molekulardynamischer Rechnungen wurde ein Erhitzen der so energieminierten Strukturen auf 300 K und anschließend ein langsames Abkühlen auf 0 K simuliert (*Simulated Annealing*). Dieser Schritt diente der Überwindung potentieller Rotationsbarrieren und gestattete dem Molekül während des Abkühlprozesses, eine energetisch günstigere Konformation einzunehmen. Während dieser Berechnungen wurden alle Proteinatome, mit Ausnahme der Spinlabel tragenden Seitenketten, fixiert und ein *generalized Born implicit solvent* Modell (Dominy und Brooks, 1999) angewandt. Bei diesem Modell wird das Solvens nicht als aus individuellen Molekülen bestehendes Lösungsmittel sondern als ein kontinuierliches Medium betrachtet, welches die Dielektrizitätskonstante des Mediums besitzt. Diese Simulation des Solvens ist weniger aufwändig als die explizite Modellierung von Solvensmolekülen und sollte dennoch elektrostatische Artefakte an der Proteinoberfläche verhindern. Die so erzeugten Molekülmodelle wurden mit Pymol 0.99 räumlich dargestellt und sind in Abb. 3.7.1, Seite 84 illustriert. Die resultierenden Abstände wurden zwischen den Nitroxid-Funktionen der MTS-gelabelten Cysteine durch Mittelwertbildung aus 170 erhaltenen energiearmen Konformeren bestimmt. Eine Auflistung der berechneten Abstände ist nachstehend in Tab. 3.7.1 aufgeführt. Die Abstände sind ebenfalls in Abb. 3.7.1 angegeben.

Tab. 3.7.1: Abstände zwischen den Nitroxid-Radikalen (NO^\bullet) der MTS-gelabelten Cysteine der beiden unterschiedlichen *E. coli* SecB-Mutanten. Die Bestimmung der Abstände erfolgte nach Simulation der SecB-Strukturen mit MTS-Labeln an den entsprechenden Positionen (90 oder 97) und deren Energieminimierung aus 170 resultierenden energiearmen Konformeren.

Untereinheit:	A - C	B - D	A - B	C - D	A - D	B - C
SecB C97	16,0 Å	14,5 Å	63,8 Å	63,9 Å	65,6 Å	59,0 Å
SecB E90C	46,3 Å	39,1 Å	74,5 Å	83,8 Å	83,2 Å	71,5 Å

Die paarweise Ähnlichkeit der Abstände spiegelt die verzerrt tetraedrische Symmetrie der Tetramere wider. Ebenfalls wurden so die unterschiedlichen Spinlabeling-Positionen und die die Label umgebende Topologie veranschaulicht. Im Vergleich zur sterisch kaum gehinderten Position 90 waren die MTS-Label der Positionen 97 weiter in die Proteinstruktur eingebettet, was die größeren Abstände zwischen den MTS-Labeln in der Mutante SecB E90C erklärt. Da bei den Energieminimierungen der MTS-gelabelten Cystein-Reste nur energieähnliche, nicht aber räumlich deckungsgleiche Konformationen erzeugt wurden, sind die erhaltenen Abstände in gewissen Grenzen zufällig und bedürfen weiterer experimenteller Bestätigung.

Zum Vergleich sind die entsprechenden C_α -Abstände, die aus den Daten der SecB-Kristallstruktur

(Dekker *et al.*, 2003) ermittelt wurden, in Tab. 3.7.2 eingetragen. Die paarweise Ähnlichkeit der Distanzen ist sogar noch deutlicher in den C_{α} -Abständen zu erkennen. Die unterschiedlichen Distanzen zwischen den Nitroxid-Funktionen der MTS-Label der Untereinheiten A - D im Vergleich zum Abstand B - C („Diagonalen“ in der SecB-Tetramerprojektion in Abb. 3.7.1, Seite 84) zeigen sich bereits in den C_{α} -Positionen des Protein-Rückgrats und pflanzen sich durch die eingebauten Spinlabel fort.

Tab. 3.7.2: Auf der SecB-Kristallstruktur (Dekker *et al.*, 2003) basierende Abstände zwischen den entsprechenden Rückgrat- C_{α} -Atomen der MTS-tragenden Cysteine in den SecB-Mutanten SecB C97 und SecB E90C. Die Daten wurden durch *Molecular Modeling* mit dem Programm Discovery Studio 2.5 erhalten.

C_{α} -Abstände zwischen den MTS-tragenden Cysteinen						
Untereinheit:	A - C	B - D	A - B	C - D	A - D	B - C
SecB C97	22,0 Å	22,1 Å	55,8 Å	55,8 Å	60,5 Å	52,8 Å
SecB E90C	35,8 Å	35,3 Å	71,1 Å	71,5 Å	73,9 Å	66,2 Å

Die aus den Modellen ermittelten MTS-Abstände (Abb. 3.7.1 und Tab. 3.7.1) können nachfolgend mit den experimentell bestimmten Abständen verglichen werden. Sie bilden die Grundlage für einen späteren Vergleich zwischen freiem SecB und möglichen konformellen Änderungen, die im Chaperon durch Substratbindung hervorgerufen werden und sich in intramolekularen Abstandsänderungen widerspiegeln.

3.8 *Electron Paramagnetic Resonance (EPR)*

Die nachfolgend diskutierten EPR-spektroskopischen Untersuchungen wurden an den Chaperon-Mutanten SecB E90C und SecB C97 durchgeführt. Als Substrat diente das optimierte His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈. Für EPR-Messungen, die in Gegenwart des optimierten Modellsubstrats aufgezeichnet wurden, wurde dieses mindestens in einem vierfach molaren Überschuss bezogen auf das SecB-Tetramer eingesetzt, um substratfreie SecB-Signalanteile auf ein Minimum zu reduzieren.

Da das optimierte His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ ohne weitere Renaturierung aus den *inclusion bodies* isoliert wurde (vgl. Abschnitt 3.6.2.3 und 3.6.2.4), befindet sich das Protein bereits in einem bindungskompetenten Zustand für SecB und konnte sofort für die Komplexierung mit den Mutanten des Chaperons und die anschließenden EPR-spektroskopischen Untersuchungen eingesetzt werden.

Die Ausbildung und Charakterisierung der Chaperon-Substrat-Komplexe sowie deren Nachweis wurde bereits ausführlich in Abschnitt 3.5 erörtert. Mit diesen Erkenntnissen konnten nun EPR-Untersuchungen an substratfreien Chaperonen und den substratgebundenen Chaperon-Komplexen durchgeführt und verglichen werden.

3.8.1 *Simulation von X-Band Tieftemperatur EPR-Spektren zur Abstandsbestimmung*

Um den kurzen Abstand in der SecB-Mutante SecB C97 zu simulieren, wurden X-Band EPR-Spektren von 52 μ M SecB C97 und 52 μ M SecB C97 im Komplex mit einem fünffachen Überschuss von 260 μ M optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ bei 150 K aufgenommen (vgl. Abschnitt 5.9.3.1, Seite 139). Diese immobilisierten Spektren (schwarze Graphen in Abb. 3.8.1(A) und (B), Seite 88) wurden mit dem Programm DIPFIT 2.0 simuliert (Steinhoff *et al.*, 1997) und die besten Fitergebnisse wurden für einen Abstand von 14 Å für freies SecB C97 mit einer Verteilungsbreite von 6,0 und 15 Å für SecB C97 im Komplex mit optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ und einer Verteilungsbreite von 3,0 erhalten. Die Resultate sind nachfolgend als grüne Graphen in Abb. 3.8.1(A) und (B) dargestellt.

Der für unkomplexiertes SecB C97 ermittelte Abstand steht in guter Übereinstimmung mit den durch die molekulardynamischen (MD) Rechnungen bestimmten Werten für die kurzen Abstände zwischen den benachbarten Untereinheiten A - C und B - D (vgl. Abschnitt 3.7, Seite 84, Tab. 3.7.1).

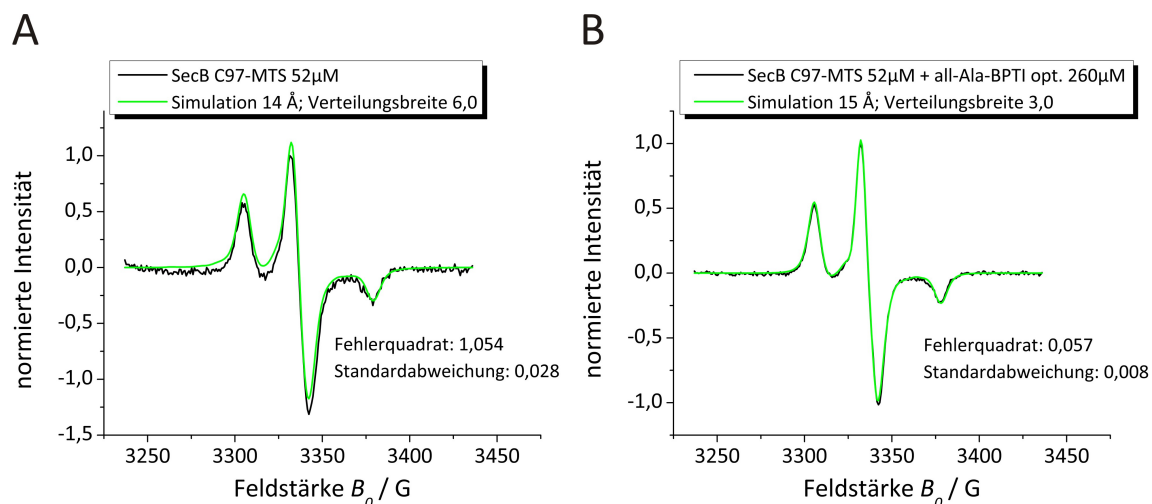


Abb. 3.8.1: Simulation der X-Band EPR-Spektren von SecB C97 mit dem Programm DIPFIT 2.0 (Steinhoff *et al.*, 1997). (A) Die bei 150 K aufgenommenen Spektren von 52 μM SecB C97 alleine und (B) im Komplex mit 260 μM optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ sind in schwarz und die zugehörigen Simulationen in grün dargestellt.

Es wurden ebenfalls immobilisierte Tieftemperatur EPR-Spektren bei 150 K von 27,2 μM SecB E90C sowie 27,2 μM SecB E90C komplexiert durch einen fünffachen Überschuss von 136 μM optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ aufgezeichnet (nicht dargestellt). Jedoch konnten die kurzen Abstände zwischen den benachbarten Untereinheiten A - C und B - D dieser SecB-Mutante, die mit 40 Å und 46 Å bereits oberhalb von 20 Å liegen (vgl. Tab. 3.7.1 der MD Rechnungen), nicht mit DIPFIT 2.0 simuliert werden, da die durch die entsprechenden dipolaren Wechselwirkungen verursachten Peaks im normalen CW-Spektrum nicht aufgelöst werden können. Aus diesem Grund war eine aussagekräftige Simulation dieser Abstände auf diese Weise hier nicht möglich.

X-Band Spektren beider SecB-Mutanten, welche bei 308 K aufgezeichnet wurden (nicht dargestellt), hatten trotz der vielen Konformere, die durch die MD Rechnungen in Abschnitt 3.7 bestimmt wurden, eine eingeschränkte Bewegungsfreiheit der Spinlabel gezeigt. Diese war jedoch nicht ausgeprägt genug, um daraus auf das Vorliegen nur eines einzigen Konformers schließen zu können.

3.8.2 W-Band Tieftemperatur EPR-Spektren der SecB-Mutanten

Zur Verbesserung der Auflösung der EPR-Spektren in Bezug auf ihre g-Tensor-Werte wurden Messungen im W-Band bei einer Frequenz von ~94 GHz aufgezeichnet. Aufgrund der zehnfach höheren Feldstärke verglichen mit Messungen bei X-Band Frequenzen sind die g-Tensor-Werte hier entsprechend erhöht, während die Hyperfein-Wechselwirkung mit dem Stickstoff (A-Tensor) nicht betroffen ist (Steinhoff *et al.*, 2000). Auf diese Weise kann die Auflösung der Spektren deutlich verbessert werden.

Die Elektronen Spin Echo (ESE)-detektierten EPR Messungen wurden unter Heliumkühlung bei 20 K, wie unter Abschnitt 5.9.3.2, Seite 140 beschrieben, am MPI für Polymerforschung in Mainz im Arbeitskreis Polymer-Spektroskopie (Prof. Spiess) durchgeführt.

In Abb. 3.8.2, Seite 89 und 3.8.3, Seite 90 sind die W-Band Spektren von MTS-markiertem SecB E90C und MTS-markiertem SecB C97 in Gegenwart sowie in Abwesenheit von optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ dargestellt. Es zeigen sich kleine, aber signifikante Unterschiede in Bezug auf die g_{xx} -Tensor-Werte der substratfreien und substratgebundenen Spektren, was noch einmal zur Verdeutlichung in den jeweiligen eingefügten Ausschnittsvergrößerungen hervorgehoben ist. Nach Zugabe des optimierten Modells substrats ist für beide SecB-Mutanten eine leichte Abnahme des g_{xx} -Werts in den komplexgebundenen Spektren (grüne Graphen) zu beobachten. Die hier detektierte Abnahme der g_{xx} -Werte ist reell, da die Mittellinien perfekt überlappen. Dies deutet darauf hin, dass sich die Spinlabel nach Ausbildung des Chaperon-Substrat-Komplexes in einer hydrophileren bzw. polarerer Umgebung befinden (Steinhoff *et al.*, 2000), wie unter anderem von Akdogan an TEMPO-basierten Spinsonden gezeigt wurde (Akdogan *et al.*, 2010). Folglich scheinen die Spinlabel nach der Komplexbildung verstärkt dem sie umgebenden Lösungsmittel ausgesetzt zu sein.

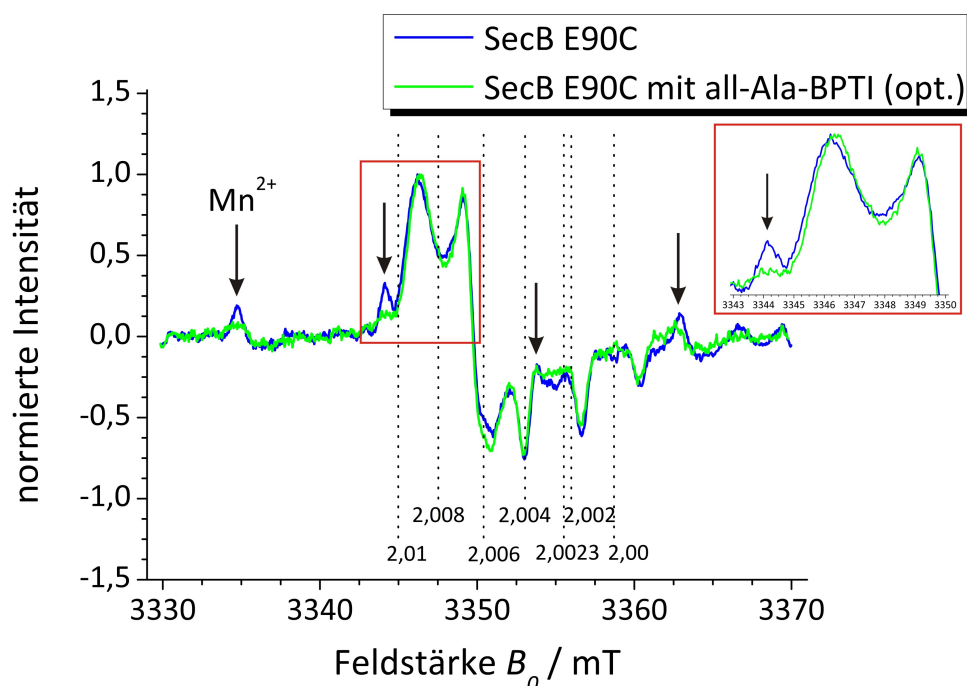


Abb. 3.8.2: Hochfeld/Hochfrequenz EPR-Spektren (W-Band, ~94 GHz) von 54 μ M SecB E90C alleine (blau) und 35 μ M SecB E90C im Komplex mit 156 μ M optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ (4,4-facher Überschuss, grün). Die W-Band EPR-Spektren sind Echo-detektiert und pseudomoduliert. Bei den durch Pfeile markierten Peaks mit einem Abstand von ~9 mT handelt es sich um Mn^{2+} -Hyperfeinlinien. Eine Skala für g-Werte ist durch die gestrichelten Linien angedeutet.

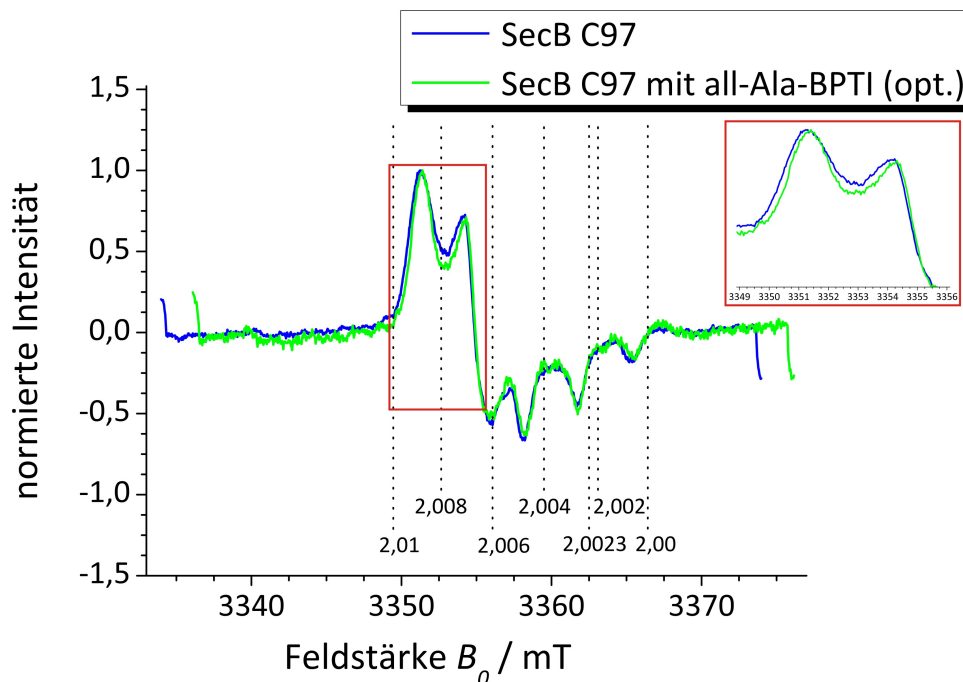


Abb. 3.8.3: Hochfeld/Hochfrequenz EPR-Spektren (W-Band, ~ 94 GHz) von $105 \mu\text{M}$ SecB C97 alleine (blau) und $50 \mu\text{M}$ SecB C97 im Komplex mit $227 \mu\text{M}$ optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ (4,5-facher Überschuss, grün). Die W-Band EPR-Spektren sind Echo-detektiert und pseudomoduliert. Eine Skala für g-Werte ist durch die gestrichelten Linien angedeutet.

Die in diesen Messungen detektierte Änderung der Polarität ist somit ein erster Hinweis, dass nach Ausbildung des Chaperon-Substrat-Komplexes eine konformelle Veränderung in den SecB-Tetrameren stattgefunden hat. Ob und inwieweit sich diese in messbaren Abstandsänderungen zwischen den Spinlabeln auswirkt, wurde mittels *Double Electron-Electron Resonance* (DEER)-Messungen untersucht und ist nachfolgend in Abschnitt 3.8.3 beschrieben.

3.8.3 DEER-Abstandsmessung von un-/komplexiertem SecB

Mit Hilfe der DEER-Technik ist es im Idealfall möglich, Abstände zwischen 20 \AA und 80 \AA entfernten Nitroxiden zu bestimmen. Die durch die in Abschnitt 3.7, Tab. 3.7.1 diskutierten MD Rechnungen bestimmten Abstände zwischen den jeweiligen Mutationsorten auf den einzelnen SecB-Untereinheiten liegen größtenteils oberhalb von 20 \AA . Durch diese Abstände verursachte Peaks dipolarer Wechselwirkungen konnten in den ungepulsten CW-EPR Spektren (vgl. Abschnitt 3.8.1, Seite 87) nicht aufgelöst werden. Daher war die erfolgreiche Detektion dieser Distanzen für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse, um potentielle konformelle Veränderungen, die in den Tetrameren der jeweiligen SecB-Mutanten bei der Komplexierung des optimierten Modellsubstrats His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ auftreten und sich in Abstandsänderungen zwischen den MTS-Spinlabeln übertragen, detektieren und nachvollziehen zu können.

Die in diesem Abschnitt diskutierten DEER-Messungen wurden ebenfalls am MPI für Polymer-

forschung in Mainz im Arbeitskreis Polymer-Spektroskopie (Prof. Spiess) durchgeführt. Das Gesamtvolumen von 80 μl wurde mit einem 20 Vol%igen Anteil an Glycerin versetzt, um ein Auskristallisieren der Probe während des Einfrierens zu vermeiden. Die in Quarzkapillaren vorbereiteten Proben wurden in *iso*-Pentan, welches in einem Bad aus flüssigem Stickstoff gekühlt war, schockgefroren. Die Aufzeichnung der Daten der dipolaren Evolutionszeit erfolgte über Nacht bei X-Band Frequenzen von 9,2 - 9,4 GHz unter Anwendung des 4-Puls DEER-Experiments (Pannier *et al.*, 2000; Jeschke *et al.*, 2000) bei einer Temperatur von 50 K (vgl. Abschnitt 5.9.3.3, Seite 141).

3.8.3.1 DEER-MESSUNGEN DES CHAPERONS SEC B E90C

Die in Abb. 3.8.4 dargestellte DEER-Messung der SecB-Mutante SecB E90C zeigt in Teilabbildung (A) die Messdaten der Zeitdomäne nach (3-D) Background Korrektur. In diesem Fall zeigen die Daten praktisch keinerlei Unterschiede in der Modulationsperiode von substratfreiem und substratgebundenem Chaperon, jedoch verringert sich die Tiefe der Modulation signifikant nach Komplexbildung zwischen SecB E90C und dem optimierten Modellsubstrat His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈. Die Spektren der Frequenzdomäne in Teilabbildung (B), die aus der Fourier Transformation (FT) der Zeitspuren hervorgehen, zeigen, dass auch nahezu keine Veränderungen im Frequenz-Peak auftreten. Dieser Peak tritt als Singularität bei $\sim 0,5$ MHz in Erscheinung, was einem Abstand von ca. 45 Å entspricht. Allerdings ist eine deutliche Änderung in der Intensität des Peaks zu detektieren, was nachfolgend in diesem Abschnitt näher diskutiert wird.

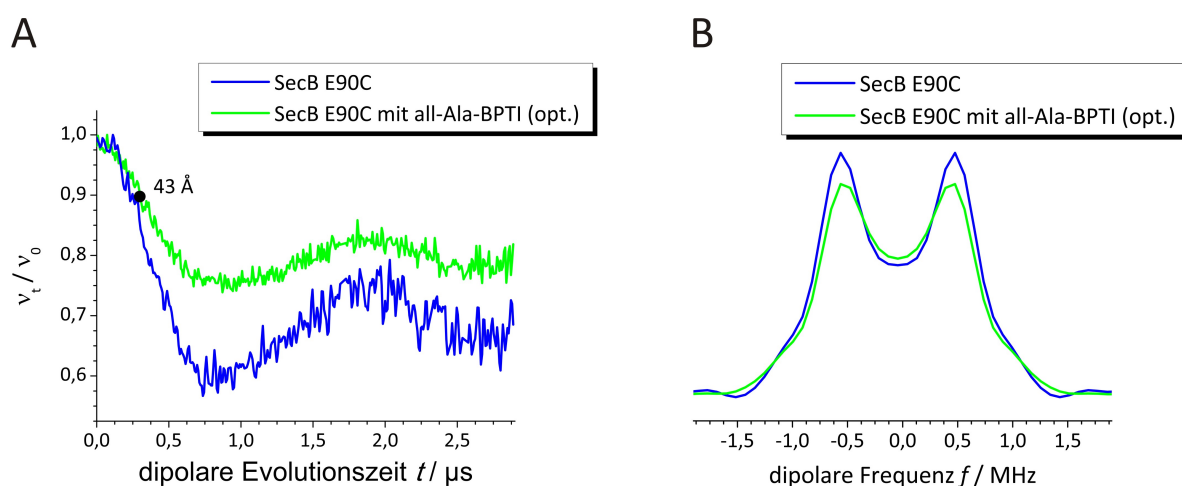


Abb. 3.8.4: DEER-Messungen von 54 μM SecB E90C alleine (blau) und 35 μM SecB E90C im Komplex mit 156 μM optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ (4,4-facher Überschuss, grün). (A) Messdaten der Zeitdomäne nach Background Korrektur (3-D). (B) Messdaten der Frequenzdomäne nach Fourier Transformation (FT) der Zeitspuren aus (A).

Um ein quantitatives Bild zu erhalten, wurde nachfolgend in Abb. 3.8.5 die Abstandsverteilungen der DEER-Messungen dargestellt. Diese wurden durch Anpassen der Gaußverteilungen, d. h.

Mittelwerte sowie Verteilungsbreiten der Zeitspuren aus Abb. 3.8.4(A), erhalten. Die Darstellung zeigt, dass es nahezu keine Veränderung im Mittelwert des Abstands von $\sim 44 \text{ \AA}$ gibt, jedoch tritt nach Zugabe des Substrats eine signifikante Verbreiterung der Abstandsverteilung auf. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten und um diese relativen Veränderungen hervorzuheben, wurden die Peaks in dieser Abbildung normiert.

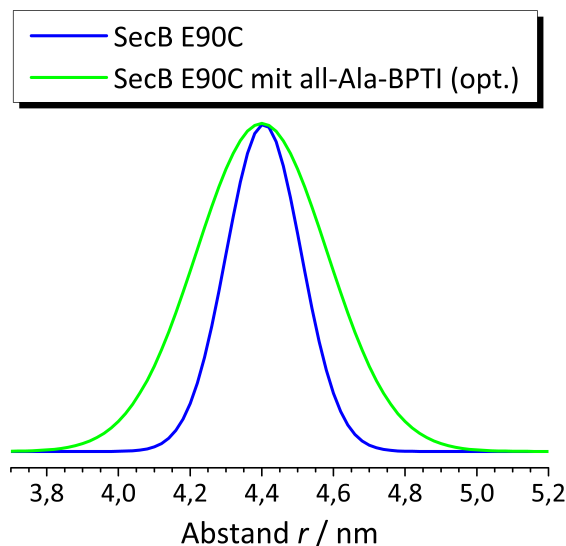


Abb. 3.8.5: Abstandsverteilung der DEER-Messungen von $54 \mu\text{M}$ SecB E90C alleine (blau) und $35 \mu\text{M}$ SecB E90C im Komplex mit $156 \mu\text{M}$ optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ (4,4-facher Überschuss, grün). Die Daten wurden durch Anpassen der Gaußverteilungen (Mittelwert und Verteilungsbreite) erhalten.

Aus den für die Komplexbildung der Mutante SecB E90C erhaltenen DEER-Daten lassen sich daher zwei Dinge ableiten. Erstens kann die Verbreiterung der Abstandsverteilung in Abb. 3.8.5 die Änderung in der Modulationstiefe in den Messungen der Zeitdomäne, was im Prinzip auch der beobachteten Intensitätsabnahme der Peaks in den Spektren der Frequenzdomäne gleichzusetzen ist (vgl. Abb. 3.8.4(A) und (B)), erklären. Zweitens kann die Ursache, warum die absolute Position der zentralen Abstandspeaks identisch ist, folgendermaßen begründet werden. Die Position 90 befindet sich am Ende einer α -helikalen Loop-Region, welche wiederum durch eine kleine α -helikale Region sowie eine weitere Loop-Region an die Hauptbindungsfurche angebunden ist. Dies könnte aussagekräftige Änderungen für komplexgebundene Tetramere im Vergleich zu substratfreien Chaperonen überlagern. Um dies zu veranschaulichen, sind in Abb. 3.8.6 exemplarisch die Positionen und die Umgebung der für die Abstandsmessungen relevanten Seitenketten der Positionen 90 und 97 in der Untereinheit D des SecB-Wildtyps markiert.

All diese konformativen Möglichkeiten, die zur Flexibilität innerhalb der Sekundärstrukturelemente führen, zusammen mit der ursprünglichen lokalen Bewegungsfreiheit der gebundenen MTS-Label, könnten einfach zu groß sein, als dass sich in diesem Bereich stattfindende Änderungen direkt in eine an dieser Position messbaren Abstandsänderung übertragen und stattdessen

lediglich zu einer Aufweitung der Abstandsverteilung führen. Die Veränderungen, die im g_{xx} -Bereich der Hochfeld EPR-Spektren beobachtet werden konnten, zeigen jedoch deutlich, dass es nach Bindung des optimierten Substrats His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ an MTS-gelabeltes SecB E90C zu einer Veränderung der lokalen Umgebung, in der sich die Spinlabel befinden, kommt (vgl. Abschnitt 3.8.2, Seite 88).

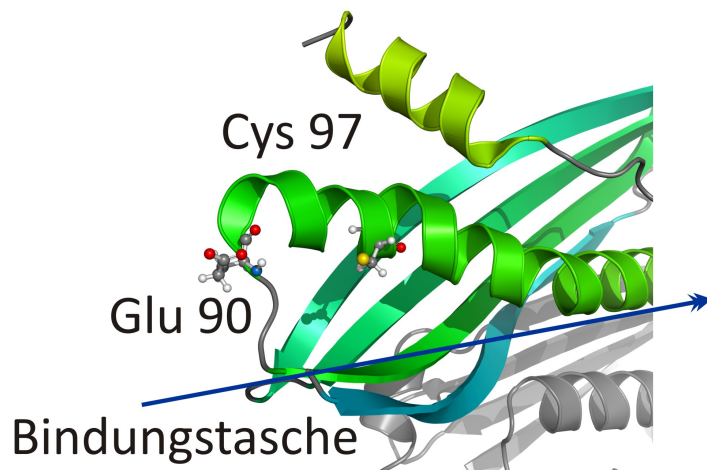


Abb. 3.8.6: Vergrößerungsausschnitt der D-Untereinheit des SecB-Wildtyps [Kristallstruktur-Datensatz PDB Code: 1QYN, RCSB PDB (Dekker *et al.*, 2003)]. Hervorgehoben sind die für Modifizierungen und Abstandsmessungen relevanten Seitenketten der Glutaminsäure an Position 90 und des Cysteins an Position 97.

Im Prinzip könnte der Rückgang der Modulationstiefe in Abb. 3.8.4(A) und sogar die Abnahme des g_{xx} -Werts (vgl. Abschnitt 3.8.2, Seite 88) auf eine Dissoziation der SecB-Tetramere nach Substratbindung zurückzuführen sein. Dies konnte jedoch in diesem Fall ausgeschlossen werden, da die Ausbildung des Chaperon-Substrat-Komplexes durch HPLC-Analyse mit einer nach dem Größenausschlussprinzip arbeitenden Trennsäule kontrolliert wurde (vgl. Abschnitt 3.5.1, Seite 54) und in diesen Messungen nur Elutionszeiten von SecB-Tetrameren beobachtet werden konnten, welche sich mit in der Literatur beschriebenen Resultaten decken (Lilly *et al.*, 2009). Ferner zeigten Untersuchungen von Krishnan, dass E90C Mutanten aktiv in der Rückfaltung des natürlichen Substrats MBP (*maltose binding protein*) sind (Krishnan *et al.*, 2004) und diese Mutation somit die Stabilität des SecB als Tetramer nicht beeinflusst.

Der durch die DEER-Messung des unkomplexierten SecB E90C bestimmte Abstand von ~ 44 Å repräsentiert einen kurzen Abstand zwischen benachbarten Untereinheiten des SecB-Tetramers und steht in guter Übereinstimmung mit den aus den MD Rechnungen bestimmten Abständen zwischen den gelabelten Positionen 90 des Chaperons (vgl. Tab. 3.7.1, Seite 85 und Tab. 3.8.1, Seite 99). In Verbindung mit den Resultaten der MALDI-ToF MS Untersuchungen (vgl. Abschnitt 3.3.2, Seite 48) und Kinetikstudien von Krishnan (Krishnan *et al.*, 2009) konnte durch diese DEER-Messungen ebenfalls eindeutig belegt werden, dass das Spinlabel ausschließlich an den Positionen 90 der monomeren Untereinheiten der SecB E90C-Tetramere stattgefunden hat und nicht an den beiden noch in der Sequenz enthaltenen nativen Cysteinen der Positionen 76 und 113. Die MALDI-ToF MS Untersuchungen hatten durch den detektierten Massenzuwachs belegt, dass pro monomerer SecB-Untereinheit nur ein einziges MTS-Label

an die Proteine gebunden wurde und in den Kinetikstudien von Krishnan zeigte sich, dass die exponierte, leicht zugängliche Position 90 wesentlich schneller und hochselektiv mit diversen Label-Reagenzien markiert werden kann als die verbleibenden Cysteine.

3.8.3.2 DEER-MESSUNGEN DES CHAPERONS SEC B C97

Die DEER-Messungen der MTS-gelabelten SecB-Mutante SecB C97 sind in den Abb. 3.8.7 und 3.8.8 dargestellt. Im Allgemeinen sind die Zeitspuren von substratfreiem und substratgebundenem SecB C97 nach (3-D) Background Korrektur deutlich bimodal, wie in Abb. 3.8.7(A) und 3.8.8(A) erkennbar ist und weisen zwei dominierende Schwingungsmuster auf. Die in Abb. 3.8.7(A) veranschaulichten hochfrequenten Schwingungen sind nur bis zu einer Evolutionszeit von 0,4 μ s erkennbar, während sich die langsamen Oszillationen über 2 μ s hinaus erstrecken (vgl. Abb. 3.8.8(A)).

Die Zeitspuren in Abb. 3.8.7(A) wurden Fourier transformiert und die resultierenden Daten in der Frequenzdomäne sind für SecB C97 in Abb. 3.8.7(B) dargestellt. Hier entspricht der Frequenz-Peak, der als Singularität bei ~ 7 MHz in Erscheinung tritt, einem Abstand von rund 20 Å. In Gegenwart von optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ tritt eine leichte Verschiebung dieses Peaks zu niedrigeren Frequenzen, d. h. größeren Distanzen auf. Um eine quantitative Analyse der kurzen Abstände in SecB C97 in Gegenwart und Abwesenheit von optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ durchzuführen, wurden die dipolaren Spektren aus Abb. 3.8.7(B) simuliert. Die Resultate dieser Rechnungen sind in Abb. 3.8.7(C) für unkomplexiertes SecB C97 und Abb. 3.8.7(D) für komplexgebundenes SecB C97 wiedergegeben.

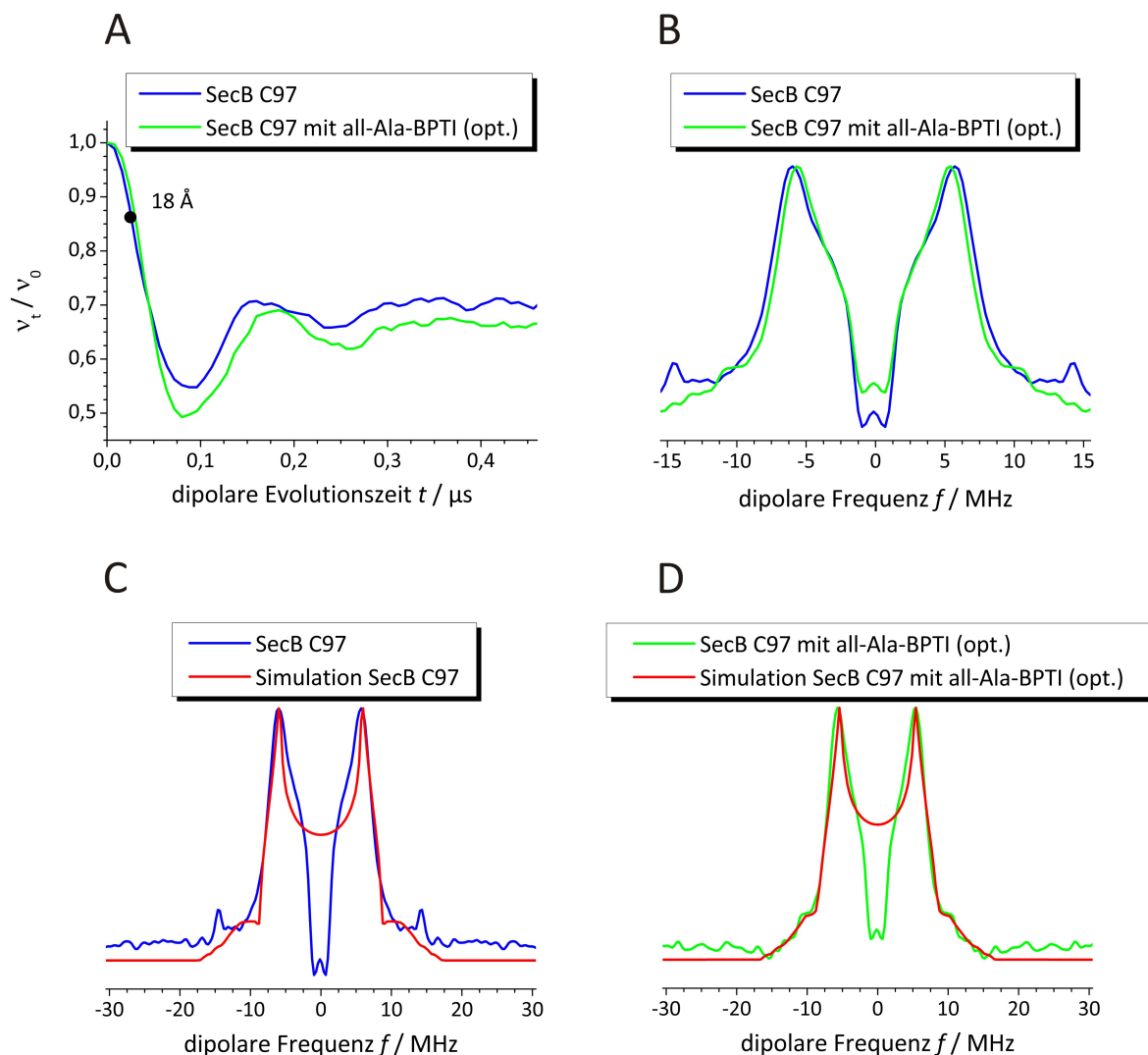


Abb. 3.8.7: DEER-Messungen von 105 μM SecB C97 alleine (blau) und 50 μM SecB C97 im Komplex mit 227 μM optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ (4,5-facher Überschuss, grün). **(A)** Messdaten der Zeitdomäne mit Fokus auf die hohen dipolaren Frequenzen, d. h. kleinen Abstände nach (3-D) Background Korrektur. Nach Substratzugabe ist ein Ansteigen der Modulationsperiode (kleinere Frequenz, d. h. größerer Abstand) zu beobachten. **(B)** Messdaten in der Frequenzdomäne nach Fourier Transformation (FT) der Zeitspuren aus **(A)** mit Fokus auf die hohen dipolaren Frequenzen. Nach Substratzugabe ist eine leichte Frequenzverschiebung zu niedrigeren Frequenzen, d. h. größeren Abständen erkennbar (Singularität bei ~ 7 MHz entsprechend einem Abstand von ca. 20 Å). **(C)** Daten der Frequenzdomäne von unkomplexiertem SecB C97 (blau) mit entsprechender Simulation des Spektrums (rot). Die Berechnung des Abstandsintervalls ergab einen Wert von 18,3 - 20,7 Å ($\pm 0,1$ Å). **(D)** Daten der Frequenzdomäne von SecB C97 im Komplex mit optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ (grün) mit entsprechender Simulation des Spektrums (rot). Das hier vorliegende Abstandsintervall entspricht einem Wert von 18,8 - 21,7 Å ($\pm 0,1$ Å).

Die berechneten Simulationen stimmen mit den dipolaren Spektren überein und zeigen, dass das Spektrum der His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-freien SecB C97 Probe mit einer Verteilung der Abstände von 18,3 - 20,7 Å ($\pm 0,1$ Å) simuliert werden kann (vgl. Abb. 3.8.7(C)). Im komplexgebundenen Spektrum mit optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ (vgl. Abb. 3.8.7(D)) sind die Abstände, die das dipolare Spektrum simulieren, leicht aber signifikant verschoben. Es wurde eine Abstandsvertei-

lung von $18,8 - 21,7 \text{ \AA}$ ($\pm 0,1 \text{ \AA}$) erhalten, was ebenfalls in Tab. 3.8.1, Seite 99 dokumentiert ist (Haimann *et al.*, 2011). Um das experimentelle dipolare Spektrum hinreichend zu simulieren, war eine Verteilung der dipolaren Kopplungsfrequenzen notwendig. Die Bandbreite der Abstände spiegelt wider, dass es sich hier um ein Ensemble von bestimmten lokalen Konformationen der gebundenen Spinlabel handelt. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine inhärente konformelle Flexibilität aufgrund der MTS-Seitenkette sowie der relativ flexiblen Sekundärstrukturelemente, an die das Spinlabel gebunden ist, vorliegt.

Bei der quantitativen Analyse der langsamen dipolaren Schwingungen, welche in Abb. 3.8.8(A) dominieren, konnten die anfänglichen schnellen Modulationen aus Abb. 3.8.7(A) außer Acht gelassen werden, da diese für Evolutionszeiten jenseits von $0,4 \mu\text{s}$ gedämpft sind. Für die langen Abstände, d. h. kleinen Frequenzen, sind mögliche Änderungen in der Modulationsperiode nach Substratzugabe rein optisch nur schwer aus den Evolutionszeiten abzuleiten. Daher wurden die Gaußverteilungen der Zeitspuren (Mittelwert und Verteilungsbreite) aus Abb. 3.8.8(A), die sich auf die kleinen dipolaren Frequenzen konzentrieren, gefittet. Es ergaben sich die in Abb. 3.8.8(B) dargestellten Abstandsverteilungen. Die Spektren zeigen die Abstandsverteilung für substratfreies und substratgebundenes SecB C97. Es tritt eine deutliche Veränderung im mittleren Abstand von $58,6 \text{ \AA}$ nach $56,5 \text{ \AA}$ auf, und die Verteilung der Abstände weitet sich nach Substratzugabe erheblich auf.

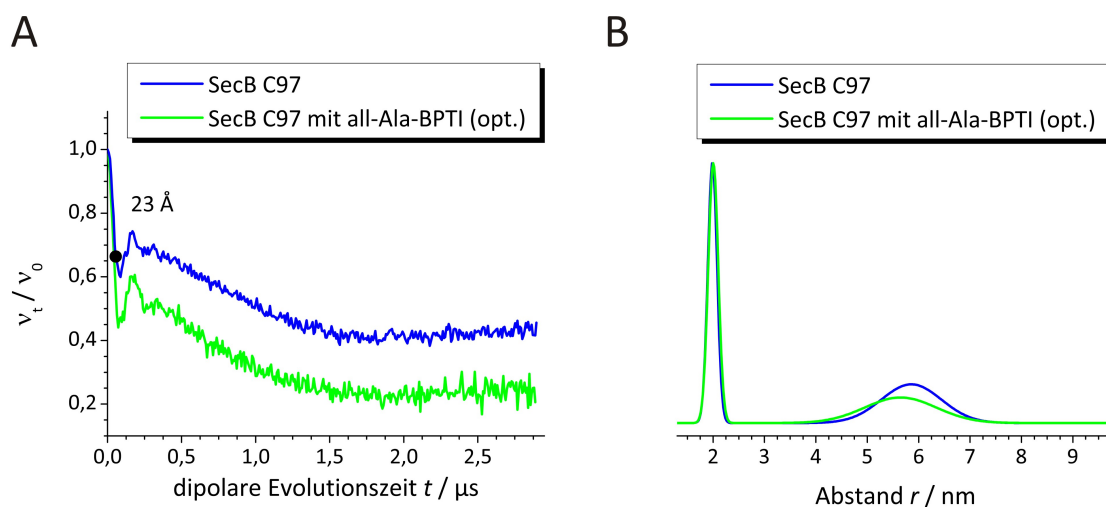


Abb. 3.8.8: DEER-Messungen von $105 \mu\text{M}$ SecB C97 alleine (blau) und $50 \mu\text{M}$ SecB C97 im Komplex mit $227 \mu\text{M}$ optimiertem $\text{His}_6^{\text{T}}\text{-all-Ala-BPTI}_{1-58}$ (4,5-facher Überschuss, grün). **(A)** Messdaten der Zeitdomäne mit Fokus auf die kleinen dipolaren Frequenzen, d. h. großen Abstände nach (3-D) Background Korrektur. Die anfänglich schnellen Modulationen sind in Abb. 3.8.7(A) beschrieben. **(B)** Die Abstandsverteilung der DEER-Messungen, erhalten durch Anpassen der Gaußverteilungen (Mittelwert und Verteilungsbreite) der Zeitspuren aus **(A)** mit Fokus auf die kleinen dipolaren Frequenzen, zeigt eine Veränderung im Mittelwert von $\sim 57 \text{ \AA}$ und die Verteilung der Abstände vergrößert sich nach Substratzugabe erheblich. Die Abstände um 20 \AA können in dieser Abbildung vernachlässigt werden, da sie bereits in Abb. 3.8.7(A) und (B) analysiert wurden.

Da sich die in dieser Mutante gspinlabelte Position 97 in einer α -helikalen Region befindet, die selber wiederum nur durch eine Loop-Region an das Zentrum des Chaperons angebunden ist, gibt es für diese Mutante im Vergleich zur Mutante SecB E90C deutlichere Hinweise darauf, dass eine Art der Konformationsänderung bei der Bindung des optimierten Modellsubstrats His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ stattfindet. In diesem Fall ermöglichen im Wesentlichen zwei detektierte Bereiche der Abstandsverteilungen, Aussagen über die Konformation des Tetramers zu treffen. Der erste Abstandsbereich von 20 Å stammt von benachbarten Spinlabeln, die sich auf derselben Seite des Tetramers befinden, d. h. der Abstand zwischen den Untereinheiten A - C bzw. B - D (vgl. linker Teil der Abb. 3.7.1, Seite 84). Der zweite Bereich, der Abstände in der Größenordnung von 60 Å umfasst, spiegelt die Distanz zwischen gegenüberliegenden Spinlabeln des Tetramers, höchstwahrscheinlich den diagonalen Abstand zwischen den Untereinheiten B - C (vgl. Tab. 3.8.1, Seite 99), wider. Wie aus Tab. 3.8.1 und Abb. 3.7.1 ersichtlich, ergaben molekulardynamische (MD) Simulationen allerdings zwei unterschiedliche Abstände zwischen den benachbarten Spinlabeln der Untereinheiten A - C und B - D. Jedoch liegt die hier ermittelte kürzere Distanz B - D mit 14,5 Å unterhalb der Detektionsgrenze der DEER-Messungen und konnte daher in diesen nicht detektiert werden. Ganz ähnlich verhält es sich im Fall der Abstände zwischen den Spinlabeln auf gegenüberliegenden Seiten des Tetramers. Von den zwei im Tetramer auftretenden Diagonaldistanzen konnte mit Hilfe der DEER-Messungen nur diejenige unterhalb von 60 Å aufgelöst werden (vgl. Tab. 3.8.1). Der Diagonalabstand A - D von 65,6 Å, der durch MD Simulationen bestimmt wurde (vgl. Abb. 3.7.1), liegt oberhalb des Auflösungsvermögens dieser DEER-Messungen.

Die DEER-Daten der kurzen Abstände (vgl. Abb. 3.8.7, Seite 95) und die der langen Distanzen (vgl. Abb. 3.8.8, Seite 96) können unabhängig voneinander interpretiert werden. Für die kurzen Abstände, d. h. benachbarte Spinlabel auf derselben Seite des Tetramers, ist eine Verkleinerung der dipolaren Frequenz und somit eine Vergrößerung des Abstands zwischen den Labeln nach Substratbindung zu verzeichnen. Dies wurde, wie bereits zuvor erläutert, durch Simulation der dipolaren Spektren quantifiziert. Für den größeren Abstand, d. h. Spinlabel auf diagonal gegenüberliegenden Seiten des Tetramers, verkürzt sich der mittlere Abstand erheblich und gleichzeitig kommt es zu einer Verbreiterung der Verteilungsbreite im Spektrum des komplexgebundenen SecB. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Maximalwerte für Abstände, die sich in Abb. 3.8.8(B) in der rechten Flanke des Abstandspeaks widerspiegeln, im substratfreien und substratgebundenen Spektrum identisch sind. Dies kann folgende Ursache haben: Die Konformation und damit auch der Abstand im substratfreien SecB C97 stellt bereits die längste Ausdehnung zwischen den Spinlabeln dar, welche sich bei Substratbindung lediglich verkürzt. Dies würde das Bild eines SecB-Tetramers, das sich nach Bindung des optimierten Modellsubstrats His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ doppelscherenartig aufweitet, vollkommen bestätigen (vgl. Abb. 3.8.9, Seite 98).

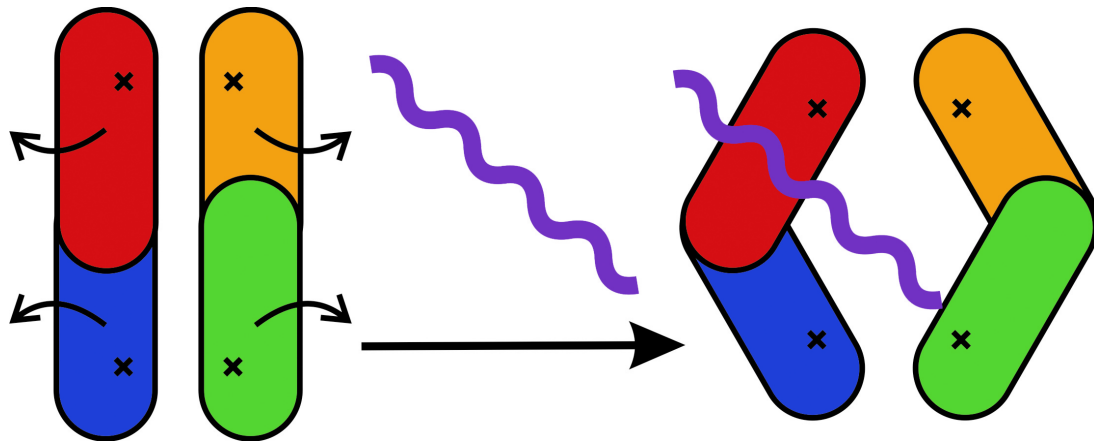


Abb. 3.8.9: Schematisches Modell der Substratbindung von SecB. Die Aufweitung des SecB-Tetramers nach Komplexierung des Substratmoleküls gleicht dem Öffnen zweier Scheren.

Zusammengenommen zeigen diese DEER-Daten, dass die MTS-gelabelte Mutante SecB C97 einen viel besseren Aufschluss über die Veränderungen, die im Chaperon nach Komplexierung des optimierten Modellsubstrats auftreten, ermöglicht. Die Position 97 befindet sich näher am Zentrum des Tetramers und das Auftreten zweier unterschiedlicher Sets an Distanzen, spricht die Abstände zwischen benachbarten Untereinheiten auf derselben Seite des Tetramers und die diagonalen Abstände (vgl. linker Teil Abb. 3.7.1), erlaubt es, globalere Einblicke in die komplexen Änderungen nach Substratbindung zu erlangen.

Die Daten der MD Rechnungen, DIPFIT 2.0 Simulationen sowie DEER-Abstandsmessungen der Mutanten SecB E90C und SecB C97 sind in Tab. 3.8.1 zusammengefasst. Die experimentell aus den DEER-Messungen erhaltenen Abstände stehen generell in guter Übereinstimmung mit den aus MD Rechnungen erhaltenen Abstandsdaten (vgl. Abschnitt 3.7, Seite 84) sowie den Abständen aus DIPFIT 2.0 Simulationen der CW-EPR Spektren (vgl. Abschnitt 3.8.1, Seite 87) und bestätigen so diese theoretisch ermittelten Werte. Die Abweichung zwischen den Werten der MD Rechnungen (16,2 Å), CW-EPR Simulationen (14 - 15 Å) und DEER-Messungen (18 - 22 Å) im Fall des kurzen Abstands zwischen benachbarten Untereinheiten in der Mutante SecB C97 kann auf einer Reihe von Gründen beruhen. Beispielsweise neigen CW-EPR Simulationen dazu, kurze Abstände überzubetonen, während die Empfindlichkeit der DEER-Messungen es nicht vermag Abstände, die kürzer als 15 Å voneinander entfernt sind, aufzulösen.

Tab. 3.8.1: Vergleich der durch DEER-Messungen erhaltenen Abstände zwischen den Nitroxid-Radikalen (NO•) der MTS-Label mit den berechneten Daten, die durch *Molecular Modeling* und durch Simulation der aufgezeichneten EPR-Spektren erhalten wurden. Aufgeführt sind die Daten der unkomplexierten SecB-Mutanten und in Klammern die Daten von SecB im Komplex mit Codon-optimiertem His^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈.

Methode der Abstands- bestimmung:	SecB E90C	SecB C97	
	(+ opt. all-Ala-BPTI)	(+ opt. all-Ala-BPTI)	
	kurze Distanzen	kurze Distanzen	lange Distanzen
<i>Molecular Modeling</i> (Discovery Studio 2.5/Energie- minimierung mit CHARMM)	46,3 Å & 39,1 Å ¹	16,0 Å & 14,5 Å ²	65,6 Å & 59,0 Å ³
DEER-Messungen (im X-Band)	~44 Å (~44 Å)	19,5 Å ± 0,1 Å ⁴ (20,3 Å ± 0,1 Å) ⁵	58,6 Å ⁶ (56,5 Å) ⁷
Simulation (DIPFIT 2.0/Steinhoff)		14 Å (15 Å)	

¹Aus 170 energiearmen Konformationen, welche aus dem *Simulated Annealing* resultierten, gemittelte Abstände zwischen den Untereinheiten A - C und B - D. Die Werte für den Abstand A - C variieren zwischen 51,7 Å und 41,6 Å. Ein Wert von 44 Å, wie er in den DEER-Messungen bestimmt wurde, tritt 18 Mal in der MD Simulation auf.

²Aus 170 energiearmen Konformationen, welche aus dem *Simulated Annealing* resultierten, gemittelte Abstände zwischen den Untereinheiten A - C und B - D. Die Werte für den Abstand A - C variieren zwischen 16,3 Å und 15,8 Å. Für den entsprechenden Abstand zwischen den Untereinheiten B - D (kurzer Abstand auf der gegenüberliegenden Tetramerseite) ergaben sich Werte zwischen 13,4 Å und 15,1 Å mit einem Mittelwert von 14,5 Å. Dieser Abstand kann nicht durch DEER-Messungen aufgelöst werden. Daher konnte eine eindeutige Zuordnung des gemessenen DEER-Abstands von 19,5 Å zu den Untereinheiten A - C getroffen werden.

³Aus 170 energiearmen Konformationen, welche aus dem *Simulated Annealing* resultierten, gemittelte Abstände zwischen den Untereinheiten A - D und B - C. Für den Abstand zwischen den Untereinheiten A - D wurde ein mittlerer Abstand von 65,6 Å berechnet, welcher durch DEER-Messungen nicht aufgelöst werden konnte. Die Werte für den Abstand B - C variieren zwischen 59,2 Å und 58,9 Å. Daher konnte der gemessene DEER-Abstand von 58,6 Å den Untereinheiten B - C zugeordnet werden.

⁴Mittelwert der simulierten Fitergebnisse von 18,3 - 20,7 Å.

⁵Mittelwert der simulierten Fitergebnisse von 18,5 - 21,7 Å.

⁶Standardabweichung $\sigma = 0,82$ Å.

⁷Standardabweichung $\sigma = 0,98$ Å.

3.9 Diskussion der Daten

Im letzten Teil dieser Arbeit wurden EPR-Techniken eingesetzt, um strukturelle Veränderungen, die in Mutanten des Chaperons SecB durch Wechselwirkung mit einem Modellsubstrat, dem *bovine pancreatic trypsin inhibitor* (BPTI), auftreten, zu untersuchen. W-Band Puls Elektronen Spin Echo (ESE)-detektierte EPR-Spektren konnten selbst kleinste Veränderungen in den einzelnen g-Tensor-Komponenten bei Substratbindung auflösen. Um Abstandsinformationen zwischen den an definierte Positionen der Chaperone kovalent angebondenen Spinlabel zu erhalten, wurden *Double Electron-Electron Resonance* (DEER)-Messungen bei X-Band Frequenzen durchgeführt. Das entscheidende Resultat dieser Untersuchungen, dass die Bindung des Modellsubstrats eine doppelscherenartige Aufweitung der Quartärstruktur des SecB verursacht, bestätigt nicht nur bisherige Erkenntnisse, sondern weitet diese deutlich aus (Haimann *et al.*, 2011). In den vorangegangenen Untersuchungen wurde der SecB-Wildtyp, der in seiner natürlichen Form vier Thiolgruppen pro monomerer Untereinheit enthält, mit dem Spinlabel 4-(3-Iod-2-oxopropyliden-1-)-2,2,3,5,5-pentamethyl-imidazolin-1-oxyl (IOPI) markiert (Panse *et al.*, 2001). Obwohl Panse mittels MALDI-ToF MS Untersuchungen zeigen konnte, dass die Position C97 bevorzugt modifiziert wurde, blieb die Ungewissheit bestehen, dass das Labeling nicht positionsspezifisch erfolgte. Zugänglichkeitsstudien von Krishnan, welche mit Hilfe von *Molecular Modeling* durchgeführt wurden sowie Kinetikstudien, die die Reaktionsgeschwindigkeit mit Acrylodan untersuchten, bestätigten später, dass die Cysteine der Positionen 97 verglichen mit den übrigen Cysteinen in der Tat am schnellsten reagieren. Dies wird für die in dieser Arbeit relevanten Mutationsorte lediglich und sehr deutlich von der Position 90 der Mutante SecB E90C übertroffen (Krishnan *et al.*, 2009).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde daher eine SecB-Mutante geschaffen, SecB C97, die nur noch ein einziges Cystein pro monomerer Untereinheit an den Positionen 97 enthält. Dies ermöglicht das eindeutige Labeln dieser definierten Position, wie auch durch MALDI-ToF MS Analysen belegt werden konnte. Im Fall der hochreaktiven Position 90 der Mutante SecB E90C waren die benachbarten nativen Cysteine der Positionen 97 und 102 mutiert, während die unreaktiven Cysteine 76 und 113 beibehalten wurden. Darüber hinaus wurde für die EPR-Messungen das unspezifischere Spinlabel IOPI durch MTS ersetzt, welches absolut spezifisch mit Cysteinen reagiert, obgleich dessen Struktur eine größere Bewegungsfreiheit des Labels ermöglicht. MD Rechnungen, in denen die gesamte SecB-Struktur mit Ausnahme der jeweiligen Cysteine und der Label selbst fixiert wurde, ermöglichten die Vorhersage und Zuordnung der Spin-Spin-Abstände im Oligomer. Die bei der Bindung des Substrats beobachteten Veränderungen, sowohl im diagonalen Abstand B - C als auch in den kürzeren Distanzen zwischen Spinlabeln der benachbarten Untereinheiten A - C und B - D der Mutante SecB C97 (vgl. Abb. 3.7.1, Seite 84), waren klein, aber signifikant. Spinlabel an den Positionen E90C zeigten lediglich eine Verbreiterung der Abstandsverteilung, die auf eine konformelle Änderung im Molekül schließen lässt. Im Fall der

gelabelten Position C97, welche sich näher am Zentrum des Chaperons, aber trotzdem noch an der Protein-Peripherie befindet, vergrößerten sich die kurzen Abstände. Der Diagonalabstand hingegen verringerte sich bei Substratbindung. Diese Befunde untermauern die hier vorgeschlagene Aufweitung des SecB bei Substratbindung.

Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe um Linda Randall hatten gezeigt, dass eine Mutation an der Position C76, im damaligen Fall der Austausch der Aminosäure Cystein gegen Tyrosin (C76Y), zu einem instabilen und zur Aggregation neigenden Protein führten (Murén *et al.*, 1999). Die Mutante C97 enthält ebenfalls eine Mutation an der Position C76. Hier wurden die nativen Cysteine jedoch gegen Alanine ausgetauscht (C76A), was zu keiner Beeinflussung der Stabilität oder zu einer Dissoziation der Tetramere in Dimere oder gar Monomere führte, wie durch die beobachteten Abstände in den EPR-Messungen sowie deren Vergleich mit den Resultaten der MD Rechnungen belegt werden konnte. Darüber hinaus wurde zuvor für eine Mutante des SecB (W36Y,C76,I13A), die ebenfalls die Mutation C76A trug, nachgewiesen, dass diese aktiv in der Rückfaltung des natürlichen Substrats MBP (*maltose binding protein*) ist. Dasselbe gilt für die SecB Mutante E90C (Krishnan *et al.*, 2004).

Das hier vorgestellte Modell der scherenartigen Aufweitung der SecB-Struktur (vgl. Abb. 3.8.9, Seite 98) steht in guter Übereinstimmung mit weiteren Daten der Arbeitsgruppe Randall. Diese identifizierte Aminosäuren, die in Kontakt mit dem Substrat stehen, durch Änderungen in den EPR-Spektren von SecB-Mutanten, die selektiv an den jeweiligen Positionen spinmarkiert waren (Lilly *et al.*, 2009). Die Aminosäuren Leucin-126, Prolin-130 und Asparagin-127 zeigten starke Wechselwirkungen mit den Substraten. Sie liegen an den Kontaktstellen und Kanälen des Oligomers. Ebenso wurden für die Position 20 (Asparaginsäure) „signifikante“ Wechselwirkungen beobachtet. Kontaktstellen, die an der Schnittstelle der Dimeren gebildet werden, wurden bereits basierend auf der Kristallstruktur des SecB-Tetramers vorhergesagt (Xu *et al.*, 2000).

Fazit

Die Resultate dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass es zu einer Aufweitung der tetrameren SecB-Struktur nach Bindung des Modells substrats, welches mit einem Teil der naszierenden Peptidkette *in vivo* gleichzusetzen ist, kommt. Diese Aufweitung ähnelt dem paarweisen Öffnen zweier gegenüberliegender Scheren, wie es in Abb. 3.8.9 schematisch illustriert ist. Während an der Position 97 für die Mutante SecB C97 eine leichte Konformationsänderung durch die Substratbindung beobachtet werden konnte, die so zu vergrößerten Abständen zwischen gleichseitig gelegenen Spinlabeln und kleiner werdenden Abständen zwischen sich diagonal gegenüberliegenden Spinlabeln führte, war die Position 90 der Mutante SecB E90C hiervon kaum betroffen. Insgesamt kann festgestellt werden, dass das optimierte Modells substrat an SecB bindet. Lediglich könnten die beiden Labeling-Positionen 90 und 97 unvorteilhaft gelegen sein, um einen hohen „Kontrast“ zwischen substratfreiem und substratgebundenem Zustand des Chaperons zu erzielen.

Vom chemischen Standpunkt aus betrachtet waren dies die bestexponierten Positionen für das Spinlabeling und sie lieferten auch den grundlegenden Beweis der Substratbindung.

4 Zusammenfassung

SecB ist ein homotetrameres, cytosolisches Chaperon mit einer Masse von 68,8 kDa, das eine wichtige Rolle bei der Proteintranslokation in *E. coli* spielt. Es wechselwirkt mit naszierenden Polypeptiden, hält diese in einem ungefalteten, translokationskompetenten Zustand und geleitet sie zum Translokon. *In vitro* bindet SecB an eine Vielzahl von Liganden, die im nicht-nativen Zustand vorliegen. Frühere Arbeiten untersuchten die Konformation des 6,5 kDa schweren Modells substrats *bovine pancreatic trypsin inhibitor* (BPTI) sowie die Konformation von SecB selbst mit Hilfe von *Site-directed Spinlabeling*- und fluorimetrischen Verfahren unter Excimeren-Bildung. Es wurden Hinweise gefunden, dass es während der Substratbindung zu konformellen Änderungen in SecB kommt.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der genaueren Untersuchung dieser Effekte hinsichtlich der im Chaperon SecB auftretenden konformativen Änderungen. Zu diesem Zweck wurde eine SecB-Mutante verwendet, die ein neues exponiertes, hochreaktives Cystein nach Entfernen der benachbarten intrinsischen Cysteine aufwies und eine SecB-Mutante geschaffen, die nur noch ein einziges Cystein pro Untereinheit enthielt. In der Mutante SecB E90C waren die Cysteine von jeder der vier Untereinheiten an den Positionen 97 und 102 gegen Alanine ausgetauscht und an den Positionen 90 die Glutaminsäure in ein Cystein gewandelt. In der Mutante SecB C97 wurden die nativen Cysteine der vier Untereinheiten an den Positionen 76, 102 und 113 durch ortsgerichtete Mutagenese in Alanine mutiert. Die Sequenzen beider Mutanten wurden in den Expressionsvektor pET-20b(+) inkloniert und so zur späteren Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie mit einem C-terminalen 6x His-Tag und einer Thrombinschnittstelle fusioniert. Das Vorliegen der richtigen DNA-Sequenzen wurde durch Sequenzierung nachgewiesen und die Expressionsplasmide in ultra-kompetente KRX-Zellen transformiert. Nach der Expression in 2xYTA-Medien und Zellyse mit Ultraschall befanden sich die SecB-Proteine im löslichen Zellüberstand und wurden in hoher Ausbeute und Reinheit durch schrittweise Erhöhung der Imidazol-Konzentration während der Nickel-Affinitätschromatographie isoliert. Die erfolgreiche Abspaltung des 6x His-Tags mit Thrombin wurde durch SDS-PAGE und ELISA mit dem monoklonalen Maus-Anti-His₆-Antikörper belegt. Die Ausbeute an SecB-Tetrameren aus einem Liter Kulturmedium betrug durchschnittlich 111 mg und die Reinheit der Proteine lag nach densitometrischer Bestimmung bei nahezu 100%. Somit konnte die Isolierungsmethode verglichen mit früheren Arbeiten optimiert und zeitsparender gestaltet werden.

Für die späteren EPR-spektroskopischen Messungen wurden die SecB-Mutanten mit dem Spinlabel 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- Δ^3 -pyrrolidin-3-methylthiosulfonat (MTS) markiert. Dieses reagiert spezifischer mit Cysteinen als das in früheren Arbeiten verwendete 4-(3-Iod-2-oxopropyliden-1-yl)-2,2,3,5,5-pentamethyl-imidazolin-1-oxyl (IOPI). Die Positionen C97 bzw. E90C sind aufgrund ihrer exponierten Lage vom chemischen Standpunkt her sehr gut für die

Kopplung mit MTS geeignet. Untersuchungen mit MALDI-ToF MS bestätigten den quantitativen Erfolg des *Site-directed Spinlabeling* mit MTS an jeder der vier Untereinheiten der SecB-Chaperone.

Die drei Disulfidbrücken des nativen, kommerziell erworbenen Modellsubstrats BPTI wurden reduziert und die Thiolgruppen durch Carboxyamidomethylierung (CAM) blockiert, um eine Rückfaltung und erneute Ausbildung von Disulfidbrücken zu verhindern. Somit wurde BPTI in einen translokationskompetenten Zustand für SecB überführt. Zum späteren Nachweis der Komplexbildung wurde cam-BPTI ebenfalls mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) fluoreszenzmarkiert. Das positive Ergebnis der chemischen Modifizierungen wurde ebenfalls mittels MALDI-ToF MS bestätigt.

Die Chaperon-Substrat-Komplexbildung zwischen SecB und denaturiertem cam-FITC-BPTI wurde durch HPLC-Messungen unter Größenausschluss verfolgt. Dazu wurde cam-FITC-BPTI in sub-stöchiometrischen bis äquimolaren Konzentrationen zu einer SecB-Lösung zugegeben und der Retentionspeak des Substrats verschwand im komplexgebundenen Spektrum. Allerdings konnte keine Änderung in der Retentionszeit von SecB aufgrund der durch gebundenes Substrat erhöhten Masse im Komplex festgestellt werden. UV/Vis- und fluorimetrische Analysen der Elutionsfraktionen bestätigten daraufhin die co-Elution von SecB und Substrat, so dass der Nachweis der Chaperon-Substrat-Komplexbildung erbracht wurde.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit eine Cystein-freie Mutante des Modellsubstrats BPTI, His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈, geschaffen, in deren Aminosäuresequenz alle sechs nativen Cysteine durch Alanine ersetzt wurden. So konnte ebenfalls eine bindungskompetente, entfaltete Struktur ohne Disulfidbrücken realisiert und die chemische Modifizierung des kommerziellen BPTI sowie die damit verbundenen Ausbeuteverluste umgangen werden. Die Darstellung des rekombinanten Proteins gelang mit Hilfe eines synthetischen Oligonukleotids, nachdem dessen Codons für die Proteinexpression im Wirt *E. coli* optimiert worden waren. Das optimierte Oligonukleotid wurde aus dem Vektor pMA in den Expressionsvektor pET-20b(+) umklont und das Vorliegen der richtigen DNA-Sequenz durch Sequenzierung verifiziert. Die Expressionsplasmide wurden in ultra-kompetente KRX-Zellen transformiert. Nach Expression in *E. coli* und Lyse der Zellen mit Ultraschall wurde optimiertes His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ aus den *inclusion bodies* durch Aufschluss mit denaturierendem Puffer und anschließender Nickel-Affinitätschromatographie isoliert. Aufgrund der denaturierenden Bedingungen lag das Modellsubstrat bereits in einer bindungskompetenten Form für die Komplexbildung mit SecB vor. Allerdings zeigten sich in der SDS-PAGE noch weitere geringe Proteinverunreinigungen. Es gelang, höhermolekulare Verunreinigungen vom 8 kDa schweren Zielprotein durch Ultrazentrifugation und Gelfiltration abzutrennen, was zu einer 24%igen Steigerung der Reinheit führte. Allerdings konnte ein ebenfalls spezifisch überexprimiertes 13 kDa schweres Protein auf diese Weise nicht separiert werden. Ein mögliches Aggregieren des Zielproteins konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Im Rahmen dieser Arbeit war keine Optimierung der Isolierungsmethode für optimiertes His₆^T-all-

Ala-BPTI₁₋₅₈ mehr möglich. Die Charakterisierung des rekombinanten Modellsubstrats gelang mittels SDS-PAGE und ESI-MS/MS. Das 13 kDa schwere Protein konnte auf diese Weise nicht eindeutig identifiziert werden.

Mit Hilfe des *Molecular Modeling* wurden aus dem Datensatz der SecB-Wildtyp Kristallstruktur von *E. coli* die theoretischen Abstände zwischen den Nitroxid-Radikalen der MTS-gelabelten Cysteine der SecB-Tetramere im substratfreien Zustand berechnet. Zu diesem Zweck wurden die Kristallstrukturdaten hinsichtlich der Veränderungen in den SecB-Mutanten SecB E90C und SecB C97 modifiziert. Für die Mutante SecB E90C wurden alle Cysteine der Positionen 97 und 102 an jeder der vier Untereinheiten durch Alanine ausgetauscht und die Glutaminsäure an den Positionen 90 durch ein MTS-gelabeltes Cystein ersetzt. Analog wurden für SecB C97 alle Cysteine der Positionen 76, 102 und 113 durch Alanine substituiert und die verbleibenden Cysteine C97 mit dem Spinlabel MTS modifiziert. Eine Energieminimierung der Spinlabel-Konformation innerhalb der Proteine wurde mit Hilfe von molekulardynamischen (MD) Rechnungen erzielt. Dazu wurde das Kraftfeld charm22 der Kraftfeld-Maschine CHARMM mit den Minimierungsalgorithmen *Steepest Descents* und *Conjugated Gradient* angewandt. Die resultierenden Abstände wurden zwischen den Nitroxid-Funktionen der MTS-gelabelten Cysteine durch Mittelwertbildung aus 170 erhaltenen energiearmen Konformeren bestimmt. Hierbei wurde eine paarweise Ähnlichkeit der Abstände festgestellt, die sich bereits in den C_α-Abständen des Proteinerückgrats zeigte. Die dort auftretenden leichten Verzerrungen pflanzten sich in den Abständen zwischen den MTS-Labeln fort. Diese theoretisch ermittelten Abstände ermöglichten den Vergleich mit den experimentell bestimmten Abstandsdaten und gestatteten so auch die Zuordnung der gemessenen Abstände im Oligomer.

Die EPR-spektroskopischen Untersuchungen wurden an den Mutanten SecB E90C und SecB C97 im substratfreien und substratgebundenen Zustand mit einem mindestens vierfach molaren Überschuss an rekombinantem Modellsubstrat durchgeführt. Dadurch konnten strukturelle Veränderungen, die in den Mutanten durch Wechselwirkung mit dem Modellsubstrat auftraten, untersucht werden. Mit Hilfe von X-Band CW-Spektren wurden die kurzen Abstände (< 20 Å) benachbarter Spinlabel auf derselben Seite des Tetramers in der Mutante SecB C97 aufgelöst und simuliert. Die so ermittelten Abstände stimmten mit den aus MD Rechnungen erhaltenen Distanzen überein. Eine Simulierung der größeren Abstände in der Mutante SecB E90C war mit dieser Technik nicht möglich, da die hier auftretenden Abstände nicht in den CW-Spektren aufgelöst werden konnten.

Um eine bessere Auflösung der EPR-Spektren in Bezug auf ihre g-Tensor-Werte zu erhalten, wurden EPR-Messungen im W-Band aufgezeichnet. Diese zeigten für beide SecB-Mutanten eine leichte aber signifikante Abnahme der g_{xx}-Werte nach Substratzugabe. Dies ließ den Schluss zu, dass sich die Spinlabel nach der Komplexbildung in einer polarerer/hydrophileren Umgebung befanden und somit eine konformelle Änderung in den Chaperonen beider SecB-Mutanten nach Substratbindung auftrat.

Daher wurden *Double Electron-Electron Resonance* (DEER)-Abstandsmessungen im Nanobereich bei X-Band Frequenzen durchgeführt, um Abstandsinformationen zwischen den Spinlabeln zu erhalten. In den DEER-Messungen war es möglich, die größeren Abstände im Bereich von 20 - 60 Å, die zuvor durch MD Rechnungen bestimmt wurden, aufzulösen. Abstandsänderungen zwischen den Spinlabeln nach Substratbindung ließen auf strukturelle Änderungen in den Chaperonen schließen. Zur Quantifizierung wurden die aufgezeichneten DEER-Spektren simuliert und die so ermittelten Abstandsdaten zwischen den MTS-gelabelten Cysteinen konnten mit Hilfe der aus MD Rechnungen bestimmten Distanzen zugeordnet werden. Dies war für den kurzen Abstand zwischen benachbarten Spinlabeln auf derselben Seite des Tetramers in der Mutante SecB E90C (44 Å) sowie der Mutante SecB C97 (19,5 Å) möglich. Des Weiteren wurde so der Diagonalabstand (58,6 Å) in der Mutante SecB C97 bestimmt und zugewiesen. Die Daten standen in sehr guter Übereinstimmung mit den theoretisch ermittelten Werten. Die Komplexierung des Modellsubstrats führte zu kleinen, aber signifikanten Abstandsänderungen zwischen den Spinlabeln der Mutante SecB C97. Diese Konformationsänderung spiegelte sich sowohl in einer Vergrößerung der kurzen Distanz zwischen gleichseitig gelegenen Spinlabeln der benachbarten Untereinheiten A - C bzw. B - D als auch in der Verringerung des Abstands B - C zwischen diagonal gegenüberliegenden Spinlabeln wider. Die Position 90 der Mutante SecB E90C war hiervon kaum betroffen. Sie zeigte lediglich eine Verbreiterung der Abstandsverteilung, die, ebenso wie die Polaritätsänderung der lokalen Umgebung der Spinlabel in den W-Band Spektren, auf eine konformelle Änderung im Molekül hindeutete. Diese Beobachtungen konnten durch eine Aufweitung der Tetramerstruktur nach Substratbindung, die mit dem paarweisen Öffnen zweier gegenüberliegender Scheren vergleichbar ist, erklärt werden.

In zukünftigen DEER-Untersuchungen könnten deutlichere Effekte durch SecB-Mutanten, die beispielsweise an der zentraler im Tetramer gelegenen Position C113 spinmarkiert sind, erzielt werden. Dies führt vermutlich zu einem erhöhten „Kontrast“ zwischen substratfreier und substratgebundener Form des Chaperons. Jedoch ist diese Position sehr zentral im Protein gelegen und somit für die Spinlabeling-Experimente nur schwer zugänglich.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz wäre, zusätzlich eine Spinmarkierung am Substrat anzubringen und so durch die DEER-Abstandsmessungen bessere Einblicke in die Konformationsänderungen an den Bindungsstellen der Chaperone zu erhalten.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Für die experimentelle Durchführung der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Geräte verwendet:

Autoklav:	Dampfkochtopf, Sitram
Brutschrank:	Memmert
Chromatographie:	System Gold Nouveau (HPLC-System), Beckman System Gold Solvent Module 125, Beckman System Gold Detector Module 168, Beckman Software: Coulter Karat32, Vers. 7.0, Beckman Poly-Prep Columns (9 cm), Bio-Rad
Densitometer:	Elscript 400, Hirschmann
Dialyse:	Visking Dialysemembran Typ 27/32 (14 000 MWCO), Roth
Eismaschine:	MF22, Scotsman
Elektrophorese:	Mini-Protean 3 Cell, Bio-Rad Powerpac 300 und 3000, Bio-Rad Digitalkamera C5060 Wide Zoom, Olympus Software: Doc-IT, Vers. 2.4.0. Lichtbank, Rex HU 10, Scie-Plas Transilluminator, TFX-20.M, Fröbel
ESI:	Nano-LC System, Waters Q-ToF 2 MS, Waters NanoESI Source, Micromass PicoTip™Emitter FS360-20-10-D, New Objective
EPR:	EMX Plus, Bruker High-Q Cavity, Bruker ELEXSYS E580 cw/pulse EPR, Bruker Flexline Split-Ring Resonator ER4118X_MS3, Bruker ARS AF204, maßgefertigt für Puls EPR, ARS, Macungie

	ELEXSYS EX680 cw/pulse EPR, Bruker W-Band EN600-1021H Tera Flex ENDOR Resonator CF935 Kryostat, Oxford ITC4 Temperature Controller, Oxford Software: Xepr, Bruker
Filter:	0,45 µm-Filter, Millipore 0,22 µm-Filter, Millipore
Fluorometer:	Fluoro Max-2, ISA Jobin Yvon Spex Software: Data Max
Freezer:	Ultra low VIP Series – 80 °C, SANYO
Gefriertrocknung:	Lyovac GT-2, Leybold-Heraeus
Inkubatoren:	Luftschüttler Innova 4000, New Brunswick Scientific Wasserbadschüttler HTBTR 112, Infors AG
Kanülen:	Stericam ø 0,6 x 25 mm
Konzentratoren:	Vivaspin 20 und 6, Sartorius (3 000, 10 000 und 50 000 MWCO PES)
Küvetten:	Plastibrand (Vis), Brand Suprasil (UV), Hellma Typ 28F/Q/5, Starna 96-Well Microlon U-Form High-Binding, Greiner Bio-One
MALDI:	Ultraflex MALDI-ToF, Bruker Anchor Chip Target® Zip-Tip® Spitzen, Millipore
Mikroskop:	Axiovert 440 mit Apotom-Einheit, Zeiss
PCR:	Thermocycler GenAmp 2400, Applied Biosystems
pH-Meter:	pH 521, WTW
Pipetten:	Transferpette® S 2,5 - 1 000 µl, Brand Research 300 12-Kanal Pipette, Eppendorf Multipette plus 1 000 µl, Eppendorf Accu-Jet® Pro, Brand
Rotoren:	JA-10, JA-14 und JA-20, Beckman Ti-70, Beckman

	R-101, Eppendorf
Schüttler:	Diffusions-Entfärbe-Apparatur, Desaga Rotator SB3, Stuart
SpeedVak:	SC110, Savant
Sterilbank:	LaminAir HB2448, Heraeus
Thermomixer:	Comfort Typ 5355, Eppendorf
Ultraschall:	Sonifier B-12, Branson Sonorex RK106, Bandelin
UV/Vis-Spektrometer:	Bio Photometer, Eppendorf DU 640, Beckman UV/Vis/NIR Lambda 900, Perkin Elmer Software: UV WinLab L800/L900 EIA-Plattenreader Typ 2550, Bio-Rad
Waagen:	1601-MP8-1, Sartorius 1413-MP8-1, Sartorius
Zentrifugen:	Centrifuge 5415 C, Eppendorf Minifuge T, Heraeus J2-21, Beckman Optima™LE-80K Ultracentrifuge, Beckman

Alle weiteren Verbrauchsmaterialien waren im Arbeitskreis vorhanden.

5.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in analysereiner Form (p. a. Qualität) von folgenden Herstellern bezogen:

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Fisher Scientific, Schwerte
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5 : 1)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Merck, Darmstadt
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Steinheim
Ammonium-Hydrogencarbonat	Sigma, Steinheim
Ampicillin (Amp)	Roth, Karlsruhe

BCA-Reagenz A und B	Pierce, Weiskirchen
BPTI	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Butanol	Riedel-de-Haen, Seelze
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Citrat	Riedel-de-Haen, Seelze
Coomassie Brilliant-Blue G-250	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
dNTP-Mix	Roche, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Essigsäure	J. Baker, Deventer
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiaminotetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg
Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	Sigma, St. Louis
Glukose	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Caldic, Düsseldorf
Glycin	Serva, Heidelberg
Guanidin-Hydrochlorid (Gdn-HCl)	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Imidazol	AppliChem, Darmstadt
Iodacetamid	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
IPTG	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
<i>iso</i> -Pentan	Roth, Karlsruhe
<i>iso</i> -Propanol	Chemikalienausgabe der TU-KI
Kaliumacetat (KAc)	Riedel-de-Haen, Seelze
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid-Plätzchen (KOH)	Merck, Darmstadt
LB-Fertigmedium	Roth, Karlsruhe
Magnesiumacetat (Mg(Ac) ₂)	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fluka, Steinheim
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Riedel-de-Haen, Seelze
Manganchlorid (MnCl ₂)	im AK vorhanden
MTS	mit Dank erhalten von Prof. Dr. Kálmán Hidek, Universität Pécs, Ungarn
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe

Natriumdesoxycholat (DOC)	Sigma, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	J. Baker, Deventer
Page-Blue	Fermentas, Vilnius
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	im AK vorhanden
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Pipes	AppliChem, Darmstadt
L(+)-Rhamnose Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Pierce, Weiskirchen
Salzsäure (HCl)	Chemikalienausgabe der TU-KI
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinheim
Sinapinsäure (SA)	Sigma, Steinheim
TEMED	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Triethylammonium-Hydrogencarbonat (NEt ₃ HCO ₃)	Sigma, Steinheim
Trifluoressigsäure (TFA)	im AK vorhanden
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, Steinheim
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween [®] 20	AppliChem, Darmstadt
2xYT-Medium	Roth, Karlsruhe

Als Lösungsmittel wurde, falls nicht anders aufgeführt, ausschließlich bidestilliertes Wasser (H₂O_{dd}) verwendet.

5.1.3 Säulen/Säulenmaterial

Nachstehende Säulenmaterialien wurden für chromatographische Aufreinigungen verwendet:

Nickel-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
PD-10 Sephadex [™] G25 M	GE Healthcare, München
Zorbax GF-250 (4 µm; 9,4 x 250 mm)	Agilent, Böblingen
Symmetry 300 C18 (5 µm; 0,18 mm x 23,5 mm)	Waters, Eschborn
NanoEase Column dC18 (3 µm; 75 µm x 150 mm)	Waters, Eschborn

5.1.4 Kits

Folgende Kits wurden für die Durchführung der gentechnischen Arbeiten, zur Proteinaufreinigung und zum tryptischen Verdau verwendet:

maxXbond™	AppliChem, Darmstadt
maxXmore™	AppliChem, Darmstadt
JETSTAR Plasmid Purification Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla
Thrombin Cleavage Capture Kit	Novagen, Gibbstown
OMX-S® Pro	OMX, Weßling

5.1.5 DNA-Ladder und Proteinmarker

Für die Agarosegelelektrophorese wurde folgender DNA-Marker verwendet. Die Größenangabe der Fragmente erfolgt in bp:

GeneRuler™	10 000; 8 000; 6 000; 5 000; 4 000; 3 500;	Fermentas,
1 kb DNA Ladder	3 000; 2 500; 2 000; 1 500; 1 000; 750;	St. Leon-Rot
	500; 250	

Die nachstehenden Proteinmarker wurden für die SDS-PAGE verwendet. Die Zahlen geben die Größen der jeweiligen Proteine in kDa im Standard an:

Roti-Mark Standard	200; 119; 66; 43; 29; 20; 14,5	Roth, Karlsruhe
Protein Marker III	200; 116; 68; 43; 29; 20; 14,4; 6,5	AppliChem, Darmstadt

Zur Kalibrierung der MALDI-ToF Messungen wurde folgender Kalibrierstandard verwendet. Die Angabe der Molekulargewichte erfolgt in m/z:

Protein Calibration Standard I	16 952,30; 12 360,97; 8 565,76;	Bruker, Karlsruhe
	8 476,65; 6 180,99; 5 734,51	

5.1.6 Reagenzien, Stammlösungen und Puffer

Die Herstellung und Konzentrationen der in dieser Arbeit verwendeten Stammlösungen und Puffer sind in Tabelle 5.1.8 aufgelistet:

Tab. 5.1.8: Verwendete Stammlösungen und Puffer.

Stammlösung	Zusammensetzung
Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml)	1 g Ampicillin, ad 10 ml H ₂ O _{dd} steril filtrieren (0,45 µm-Filter), Lagerung – 20 °C
Kanamycin-Stammlösung (100 mg/ml)	0,5 g Kanamycin, ad 10 ml H ₂ O _{dd} steril filtrieren (0,45 µm-Filter), Lagerung – 20 °C
DTT-Stammlösung (100 mM)	0,15 g, ad 10 ml H ₂ O _{dd} frisch ansetzen
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Lagerung 4 °C
Gdn-HCl-Stammlösung (8 M)	76,42 g Gdn-HCl, ad 100 ml H ₂ O _{dd}
IPTG-Stammlösung (1 M)	4,77 g IPTG, ad 20 ml H ₂ O _{dd} steril filtrieren (0,45 µm-Filter), Lagerung – 20 °C
MTS-Stammlösung (100 mM)	26,4 mg MTS, 1 ml Acetonitril (getrocknet) Lagerung – 80 °C, dunkel
NaOH-Stammlösung (10 M)	200 g NaOH, ad 500 ml H ₂ O _{dd}
PMSF-Stammlösung (100 mM)	174 mg PMSF, ad 10 ml <i>iso</i> -Propanol
Rhamnose-Stammlösung (20% w/v)	10 g Rhamnose, ad 45 ml H ₂ O _{dd} steril filtrieren (0,22 µm-Filter), Lagerung – 20 °C
5x Bradford-Reagenz	0,1 g Coomassie Brilliant-Blue G-250 50 ml Ethanol (50%ig) 100 ml Phosphorsäure (85%ig) ad 250 ml H ₂ O _{dd}
50x TAE-Puffer	2 M Tris 0,05 M EDTA 4% (v/v) Essigsäure autoklavieren, pH 8,5; RT
6x Loading Dye	50% (v/v) Glycerin 50 mM EDTA; pH 8,0 0,25% (w/v) Bromphenolblau

Stammlösung	Zusammensetzung
10x SDS-Elektrophoresepuffer	250 mM Tris 1 920 mM Glycin 1% (w/v) SDS
4x SDS-Probenpuffer	500 mM Tris-HCl; pH 6,7 10% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin H ₂ O _{dd} ad 10 ml Reduktion mit 40 mM DTT 10-15 Tropfen 0,1%ige Bromphenolblaulösung
SDS-Sammelgelpuffer	1 g SDS 15,5 g Tris ad 250 ml H ₂ O _{dd} pH 6,8 (HCl)
SDS-Trenngelpuffer	1 g SDS 45,5 g Tris ad 250 ml H ₂ O _{dd} pH 8,8 (HCl)

5.1.7 Medien

Die für die Zellaufzucht verwendeten Medien und Nährlösungen sind in nachstehender Tabelle (Tab. 5.1.9) aufgeführt:

Tab. 5.1.9: Medien und Nährlösungen.

Medium	Zusammensetzung
LB-Agarplatten [Amp/Kana] (500 ml Medium)	12,5 g LB-Fertigmedium 7,5 g Agar-Agar (1,5 Vol.%) ad 500 ml H ₂ O _{dd} , autoklavieren [500 µl Ampicillin-/Kanamycin-Stammlösung zugeben]
2xYT-Flüssigmedium [Amp/Kana] (20 ml Übernachtskultur)	0,62 g 2xYT-Fertigmedium ad 20 ml H ₂ O _{dd} , autoklavieren [20 µl Ampicillin-/Kanamycin-Stammlösung zugeben]
2xYTA-Flüssigmedium (750 ml <i>large-scale</i> Kultur)	23,25 g 2xYT-Fertigmedium ad 750 ml H ₂ O _{dd} , autoklavieren 750 µl Ampicillin-Stammlösung zugeben
SOB	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ ad 500 ml H ₂ O _{dd} autoklavieren pH 7,4 (NaOH), 4 °C
SOC	SOB-Medium versetzt mit 20 mM Glukose

5.1.8 *Escherichia coli*-Stämme und Plasmide

Für die gentechnischen Arbeiten wurden die in nachstehender Tabelle 5.1.10 aufgelisteten Bakterienstämme sowie die in Tabelle 5.1.11 aufgeführten Plasmide verwendet:

Tab. 5.1.10: Für diese Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	relevanter Genotyp/Beschreibung	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15] hsdR17(r_k⁻, m_k⁺)</i>	Stratagene, La Jolla, (Bullock und Fernandez, 1987)
<i>E. coli</i> KRX	[F', <i>traD36, ΔompP, proA⁺B⁺, lacI^q, Δ(lacZ)M15] ΔompT, endA1, recA1, gyrA96(Nal^r), thi-1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), e14⁻ (McrA⁻), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), Δ(rhaBAD)::T7 RNA Polymerase</i>	Promega, Mannheim

Tab. 5.1.11: Für diese Arbeit verwendete Vektoren.

Bezeichnung	Verwendung/Resistenz	Herkunft/Referenz
pET-20b(+)	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Amp ^r	Novagen, Gibbstown
pMA	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Amp ^r	Mr. Gene, Regensburg

5.1.9 Synthetische Oligonukleotide

Die hier verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Operon (Köln), Sigma Life Science (München) und Mr. Gene GmbH (Regensburg) bezogen:

SecB _{for} NdeI	5'-CACCCATATGTCAGAACAAAACAACACTGAAATGACTTTC... ...CAGATCC-3'
SecB _{rev} XhoI	5'-CACCTCGAGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCCGCTGCTGGCA... ...TCCTGATGTTCTTCAGTACCTTCGCCAG-3'
T7 <i>for</i>	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 <i>rev</i>	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
M13 <i>rev</i>	5'-AACAGCTATGACCATG-3'
SecB_C76A <i>for</i>	5'-AATACCGCCCTGCTGAACTTCAGCCAGGAACGCGGTTTC-3'
SecB_C76A <i>rev</i>	5'-AGAAACCGCGTTCCTGGCTGAAGTTCAGCAGGGCGGTATT-3'

SecB_C102A <i>for</i>	5'-AGCATACGGGAACAGAATGTTTCGGGGCGTATGCTCCCAGG-3'
SecB_C102A <i>rev</i>	5'-CCTGGGAGCATACGCCCGAACATTCTGTTCCCGTATGC-3'
SecB_C113A <i>for</i>	5'-GCGGGATACCATGCTGGTGATGGCCTCACGAGCATAACG-3'
SecB_C113A <i>rev</i>	5'-CGTATGCTCGTGAGGCCATCACCAGCATGGTATCCCGC-3'
BPTI NdeI <i>for</i>	5'-CACCCATATGATGAAGATGAGCCGGCTCTGCCTCTCAG-3'
BPTI Thrombin	5'-GTGCTCGAGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCCGCTGCTTGG...
XhoI <i>rev</i>	...CAGGTTCTCCAGGGCCCAATAG-3'
GFP new long	5'-CACCTCTAGACGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTC-3'
XbaI <i>for</i>	
EnGFP NdeI <i>rev</i>	5'-CACCCATATGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTG-3'

5.1.10 Enzyme

Die nachstehenden Enzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit mit den von den jeweiligen Herstellern optimierten Puffersystemen verwendet:

T4 DNA-Ligase		Invitrogen, Karlsruhe
Antarktische Phosphatase		New England Biolabs, Frankfurt/Main
Taq-Polymerase		Fermentas, St. Leon-Rot
PfuTurbo® DNA Polymerase		Stratagene, La Jolla
DpnI	5'...G m6A↓ T C...3' 3'...C T↑m6A G...5'	Stratagene, La Jolla
FastDigest® NdeI	5'...CA↓TA TG...3' 3'...GT AT↑AC...5'	Fermentas, St. Leon-Rot
FastDigest® XhoI	5'...C↓TCGA G...3' 3'...G AGCT↑C...5'	Fermentas, St. Leon-Rot
XbaI	5'...T↓CTAG A...3' 3'...A GATC↑T...5'	Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin (procine)		Promega, Mannheim

5.1.11 Antikörper

Für die immunologischen Nachweise wurden die in Tabelle 5.1.14 aufgelisteten Antikörper verwendet:

Tab. 5.1.14: Für diese Arbeit verwendete Antikörper.

Antikörper	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
Anti-His ₆ (2)	mouse monoclonal antibody (Clone His-2)	1:3 000	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-Mouse IgG	F _{ab} spezific, alkaline phosphatase conjugate	1:1 000	Sigma Aldrich, Steinheim

5.1.12 Software

Zur Auswertung und graphischen Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die in Tabelle 5.1.15 aufgelisteten Programme verwendet:

Tab. 5.1.15: Für diese Arbeit verwendete Software.

Programm	Hersteller
Coulter Karat32, Vers. 7.0	Beckman
ChemDraw	CambridgeSoft Corporation
Clone Manager Professional Suite	Scientific & Educational Software
CorelDraw	Corel
Data Max	Jobin Yvon Spex
DeerAnalysis2006	Gunnar Jeschke (Jeschke <i>et al.</i> , 2006)
DIPFIT 2.0	H.-J. Steinhoff (Steinhoff <i>et al.</i> , 1997)
Discovery Studio 2.5	Accelrys
Doc-IT, Vers. 2.4.0	Olympus
Easyspin 3.0.0	easyspin.org
Flex Analysis	Bruker
JabRef	GNU
L ^A T _E X	miktex.org
LMS Image Browser	Zeiss
Mascot Search Algorithm 2.1	Matrix Science
MassLynx 4.0	Waters, Milford
Matlab	MathWorks
Origin	OriginLab Corporation
Photoshop	Adobe
ProteinLynx 2.1	Waters, Milford
Pymol 0.99	pymol.org
UV WinLab L800/L900	Perkin Elmer
Xepr	Bruker

5.2 Allgemeine Arbeitsmethoden

5.2.1 Konzentrationsbestimmungen

5.2.1.1 UV/VIS-SPEKTROSKOPIE

Die UV/Vis-Spektroskopie zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen basiert auf der UV-Absorption der Reste der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, in geringem Maße ebenfalls von Phenylalanin (Richter, 2003). Für die Messung maßgeblich ist das Absorptionsmaximum von Tryptophan bei 280 nm (A_{280} -Wert), weniger das der beiden anderen Aminosäuren bei 275 nm bzw. 257 nm. Da die Anteile dieser drei Aminosäuren in verschiedenen Proteinen variieren, unterscheiden sich auch deren A_{280} -Werte. Auf der Basis eines durchschnittlichen molaren Extinktionskoeffizienten ϵ für diese drei Aminosäuren kann jedoch die Konzentration einer Lösung mit einem A_{280} -Wert von 1,0 bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm zu etwa $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ bestimmt werden. Dies gilt allerdings nur, wenn die Probe keine oder nur geringe Mengen an Substanzen enthält, welche ebenfalls bei 280 nm absorbieren.

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann ebenfalls mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie abgeschätzt werden. Diese Problematik wird gesondert in Abschnitt 5.3.4.1 (Seite 125) behandelt.

Ebenfalls kann das Wachstum von Bakterienkulturen mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 600 nm kontrolliert werden, da der Betrag des durch die Probe gestreuten Lichts proportional zu Größe und Anzahl der in der Probe vorhandenen Zellen ansteigt (Süßmuth *et al.*, 1997). Liegt die optische Dichte (OD) der Flüssigkultur über 0,3, so muss sie verdünnt werden, da die lineare Proportionalität zur Zellzahl nur bis zu diesem Wert Gültigkeit besitzt. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wachstumskontrollen werden die Proben im Verhältnis 1:10 verdünnt.

5.2.1.2 BCA-TEST

Der BCA-Test ist eine colorimetrische Methode zur quantitativen Proteinbestimmung mit einem Testsystem der Firma Pierce. Die im Gemisch aus 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin-Natriumsalz (BCA, Reagenz A) und Kupfer(II)sulfat (Reagenz B) enthaltenen Cu^{2+} -Ionen werden in einer Biuret-Reaktion durch oxidierbare Gruppen im Protein (Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin) in alkalischem Medium zu Cu(I) -Ionen reduziert. Diese werden dann von BCA komplexiert und durch photometrische Bestimmung bei 562 nm detektiert (Smith *et al.*, 1985).

Die Durchführung erfolgt entsprechend dem Biochemischen Praktikumsskript (Trommer, 2007). Die Proben werden je nach Aufgabenstellung 50 bis 5 000-fach verdünnt.

5.2.1.3 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Die Methode nach Bradford ist, wie der BCA-Test, eine Methode zur quantitativen Proteinbestimmung, die auf einer Farbreaktion beruht. Dabei bindet der blaue Säurefarbstoff Coomassie Brilliant-Blue an Protein in saurer Lösung. Durch Anlagerung des Farbstoffs verschiebt sich das Absorptionsmaximum in charakteristischer Weise von 465 nm nach 595 nm (Richter, 2003).

Die Durchführung erfolgt gemäß Anleitung des Biochemischen Praktikumsskripts (Trommer, 2007; Holtzhauer, 1988).

5.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE stellt neben der Möglichkeit der Reinheitskontrolle eine Methode zur Molekulargewichtsabschätzung von Proteinen dar. Zu diesem Zweck wird der Siebeffekt des Polyacrylamidgels ausgenutzt, was zur Auftrennung der zu untersuchenden Proteine nach deren Größe führt. Als Referenz dient ein Proteinmarker, welcher unterschiedliche Proteine bekannten Molekulargewichts enthält und somit einen Vergleich mit den Gelbanden der Proteinproben ermöglicht. Die auf Laemmli basierende Methode (Laemmli, 1970) wird in geringfügiger Modifikation entsprechend dem Biochemischen Praktikumsskript (Trommer, 2007; Smith, 1984) unter Verwendung des in Tabelle 5.1.8 auf Seite 113 angegebenen Probenpuffers durchgeführt. Es werden 4,5%ige Sammel- und 15%ige Trenngel verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Spannung von 200 V. Anfärbt wird mit Page-Blue nach beiliegendem *fast stain protocol*.

Aufgrund ihrer geringen Konzentration ist bei einigen Proben eine TCA-Fällung (siehe 5.2.3.2, Seite 121) vor Applikation nötig.

Zusammensetzung der Gele:

Sammelgel (4,5%):	0,75 ml Acrylamidlösung 3 ml H ₂ O _{dd} 1,25 ml Sammelgelpuffer 7,5 µl TEMED kurz vor Befüllung der Kammer wenige Körnchen APS zugeben
Trenngel (15%):	7,5 ml Acrylamidlösung 3,75 ml H ₂ O _{dd} 3,75 ml Trenngelpuffer 20 µl TEMED kurz vor Befüllung der Kammer wenige Körnchen APS zugeben

Molekulargewichtsbestimmung:

Anhand der bekannten Molekulargewichte der im Proteinmarker enthaltenen Standardproteine kann durch deren logarithmische Auftragung gegen ihre Wanderungsstrecke im Gel eine Kalibriergerade erstellt werden. Mit Hilfe dieser Regressionsgeraden können nun die Molekulargewichte der zu untersuchenden Proben berechnet werden.

5.2.3 Proteinaufkonzentrierung**5.2.3.1 AUFKONZENTRIERUNG/PUFFERAUSTAUSCH MIT KONZENTRATOREN**

Ein Verfahren zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen besteht in der Verwendung spezieller Membranen. Diese haben bekannte, definierte Porengrößen, welche für kleinere Moleküle durchlässig sind, jedoch solche mit größerem Durchmesser als dem der Poren zurückhalten und diese somit aufkonzentrieren. Dies kann z.B. durch Ultrafiltration mittels Zentrifugalkonzentratoren bei 4 000 - 5 000x g, 4 °C (Vivaspin) realisiert werden. Durch dieses Verfahren ist ebenfalls ein Pufferaustausch der Probe möglich.

5.2.3.2 PROTEINFÄLLUNG MIT TRICHOLORESSIGSÄURE

Diese Methode beruht auf der Ausfällung der Proteine mit Hilfe von Trichloressigsäure (TCA) und ihrer anschließenden Wiederaufnahme in geringeren Volumina. Aufgrund der Irreversibilität ist diese Art der Proteinkonzentration jedoch lediglich in Verbindung mit der SDS-PAGE sinnvoll (Bensadoun und Weinstein, 1976).

Zusammensetzung der Reagenzien:

15%ige DOC-Lösung:	0,15 g Natriumdesoxycholat ad 100 ml H ₂ O _{dd}
72%ige TCA-Lösung:	72 g Trichloressigsäure ad 100 ml H ₂ O _{dd}
3 M Tris-Lösung:	18,17 g Tris ad 50 ml H ₂ O _{dd}

Durchführung:

Es werden 500 µl der zu fällenden Probe entnommen, mit 50 µl DOC-Lösung versetzt, durchmischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgt die Zugabe von 50 µl TCA-Reagenz. Die Probe wird sofort gevortext, gefolgt von einer 10 minütigen Inkubation auf Eis. Die so behandelten Proben werden bei 14 000 rpm und 4 °C für 20 min in der Eppendorf Centrifuge 5415 C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, erneut kurz abzentrifugiert und letzte Flüssigkeitsreste vorsichtig abpipettiert. Das so erhaltene Pellet kann nun für die

SDS-PAGE (siehe 5.2.2, Seite 120) in 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen werden, jedoch müssen die Proben noch mit 3 M Tris-Lösung neutralisiert werden. Dabei tritt ein Farbumschlag von gelb nach blau auf.

5.3 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten gentechnischen Arbeitsmethoden richten sich nach den Vorschriften von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) und werden ausschließlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt:

5.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein repetitives *in vitro* Verfahren, das eine exponentielle Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen ermöglicht (Nelson und Cox, 2008). Die zu amplifizierende DNA-Region wird hierbei von sequenzspezifischen, antiparallelen Oligonukleotiden, den Primern, flankiert. Deren Elongation wird im Laufe der PCR-Zyklen durch thermostabile DNA-Polymerasen katalysiert. Der Standard-Reaktionsansatz ist nachstehend aufgeführt. In dieser Arbeit wird die PCR zur DNA-Amplifizierung sowohl zu analytischen als auch präparativen Zwecken eingesetzt.

Pipettierschema des Standard-PCR-Reaktionsansatzes:

50 µl Ansatz:

33 µl	H ₂ O _{dd}
5 µl	10x PfuTurbo [®] Puffer
5 µl	dNTPs (2 mM)
2,5 µl bzw. 125 ng	forward Primer (10 pM)
2,5 µl bzw. 125 ng	reverse Primer (10 pM)
1 µl bzw. 10 ng	Template DNA
1 - 1,5 µl	PfuTurbo [®] DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Nachstehendes PCR-Programm wird zur experimentellen Durchführung dieser Arbeit verwendet, wobei die Primerhybridisierungstemperatur für PCR-Vorgänge zur Einführung von Punktmutationen auf 60 °C, 18 Zyklen und bei Ansätzen mit all-Ala-BPTI DNA oder GFP (*Green Fluorescent Protein*) DNA auf 62 °C bzw. 64 °C erhöht wird. Die Elongationszeit ist von der jeweiligen Größe der zu amplifizierenden DNA abhängig.

Tab. 5.3.3: Einstellungen des Thermocyclers. *) Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe der zu amplifizierenden DNA; PfuTurbo® DNA Polymerase: 500 bp/min.

PCR-Universalprogramm			
Verwendungszweck	Anzahl der Zyklen	Parameter	
		Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	1 x	95	2
Denaturierung		94	0,5
Primerhybridisierung	35 x	55 - 56	0,5
Elongation		72	*)
Finale Elongation	1 x	72	5 - 10
Kühlung/Lagerung	1 x	4	∞

5.3.2 Kolonie-PCR

Zur Identifizierung rekombinanter Klone, sprich zur Detektion der eingefügten Insert-Fragmente in Vektoren nach Ligationsreaktionen (vgl. 5.3.4.6, Seite 127) kann die Methode der Kolonie-PCR angewandt werden. Hierbei werden von den nach der Transformation (vgl. 5.3.4.7, Seite 127) des Ligationsansatzes auf der Agarplatte gewachsenen Kolonien jeweils verschiedene isolierte, monoklonale Kolonien mit einer sterilen Spitze gepickt und auf eine weitere Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum in definierten Arealen ausgestrichen. Diese Platte dient als Referenzplatte, mit deren Hilfe später auf entsprechende Klone zurückgegriffen werden kann. Sie wird bei 37 °C inkubiert.

Die Spitze mit dem entsprechenden Zellmaterial wird nun direkt im nachstehend aufgeführten PCR-Mastermix suspendiert und dient somit als Template. Mit Hilfe geeigneter Primer kann das gesuchte Fragment entsprechend Abschnitt 5.3.1, Seite 122 amplifiziert werden. Für den Zielvektor pET-20b(+) wird das Primerpaar T7 *for*/T7 *rev* (5.1.9, Seite 116) verwendet. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Klonen wird eine PCR-Reaktion mit Zellen der Kontroll-Ligation bzw. mit dem entsprechenden Vektor ohne das Ziel-Insert als Negativ-Kontrolle durchgeführt. Nach Beendigung der PCR werden die zwischen dem Primerpaar amplifizierten Genfragmente mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (vgl. 5.3.4.2, Seite 125). Durch den bei der Elektrophorese ebenfalls aufgetragenen DNA-Marker können die erhaltenen Fragmentgrößen bestimmt und mit den erwarteten Fragmenten verglichen werden. Positiv identifizierte Klone, die das gewünschte Insert tragen, weisen, im Vergleich zur Kontrolle ohne Insert, Gelbanden bei größerem Molekulargewicht auf. Diese Klone können nun von der inkubierten Referenzplatte gepickt und weiter kultiviert werden.

Zusammensetzung des PCR-Mastermix für die Kolonie-PCR (1x Reaktion):

50 µl Ansatz:

5 µl	10x PfuTurbo® Puffer
5 µl	dNTPs (2 mM)
2,5 µl	T7 <i>for</i> Primer (10 pM)
2,5 µl	T7 <i>rev</i> Primer (10 pM)
34 µl	H ₂ O _{dd}
1 µl	PfuTurbo® DNA Polymerase (2,5 U/µl)

5.3.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Das Einbringen von Punktmutationen in Gensequenzen wird mit Hilfe der ortsgerechten Mutagenese nach Vorschrift des QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kits bewerkstelligt. Zu diesem Zweck werden zuerst Primer, die die nötigen Punktmutationen enthalten, mit dem Programm Clone Manager Suite 7 entworfen. Die entsprechenden für Cystein codierenden Basentriplets werden gegen Alanin codierende Triplets ausgetauscht (SecB_C76A *for* bzw. *rev*, SecB_C102A *for* bzw. *rev*, SecB_C113A *for* bzw. *rev*, vgl. 5.1.9, Seite 116). Die Einführung der Punktmutationen erfolgt sukzessiv, basierend auf der SecB-Wildtyp-Sequenz (1QYN, RCSB PDB). Hierbei baut jede neue Mutation auf der vorigen Mutationsstufe auf und wird durch Sequenzierung (5.3.4.10, Seite 128) verifiziert.

Pipettierschema für die ortsgerechte Mutagenese:

51 µl Ansatz:

5 µl	10x PfuTurbo® Puffer
10 ng	Template DNA
125 ng	forward Primer (10 pM)
125 ng	reverse Primer (10 pM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
3 µl	QuickSolution
ad 50 µl	H ₂ O _{dd}
1 µl	PfuTurbo® DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Im Anschluss an die PCR (5.3.1, Seite 122) wird die parentale, unmutierte DNA mit 1 µl DpnI (10 U/µl) durch 1 h Inkubation bei 37 °C verdaut. Die Plasmid-DNA wird entsprechend Abschnitt 5.3.4.7, Seite 127 in die entsprechenden ultra-kompetenten Zellen (5.4.2, Seite 128) transformiert.

5.3.4 Methoden zur DNA-Klonierung

5.3.4.1 ABSCHÄTZUNG DER NUKLEINSÄUREKONZENTRATION

Wie bereits in Abschnitt 5.2.1.1 auf Seite 119 erwähnt, kann die Konzentration von DNA und RNA mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie bestimmt werden. Dabei erfolgt die Messung der Absorption bei 260 nm in Mikro-UV- Küvetten der Dicke 1 cm. Nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) entspricht hierbei eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 30 µg/ml Oligonukleotiden. Um die Reinheit der Probe zu bestimmen, wird der Quotient der Absorption $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ gebildet. Dabei werden die durch Proteine verursachten Verunreinigungen bei 280 nm, wie unter 5.2.1.1 beschrieben, erfasst. Ein Verhältnis von $\frac{OD_{260}}{OD_{280}} = 1,7 - 2,0$ gilt als rein und proteinfrei. Kontaminationen durch Substanzen wie Kohlenhydrate, Peptide, Phenole oder aromatische Verbindungen werden durch eine Absorption bei 230 nm erfasst. Das Verhältnis $\frac{OD_{260}}{OD_{230}}$ einer reinen Probe liegt etwa bei einem Wert von 2,2.

Zur Konzentrationsmessung werden 2 µl DNA mit 68 µl H₂O_{dd} verdünnt. Als Blank dient ebenfalls H₂O_{dd}.

5.3.4.2 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung sowie Größenbestimmung von DNA. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente werden Gele mit 1,2 - 2,0% (w/v) Agarosegehalt angefertigt. Die entsprechende Menge Agarose wird dazu mit 1x TAE-Puffer versetzt, bis zur vollständigen Auflösung in der Mikrowelle gekocht und nach Abkühlen auf ca. 60 °C in den Gelschlitten der Elektrophoresekammer gegossen. Die zu analysierenden Proben werden mit der entsprechenden Menge an 6x Loading Dye versetzt und in die Geltaschen eingebracht. Zum späteren Größenvergleich werden ebenfalls 10 µl des 1 kb DNA Ladder Markers aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in 1x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 120 V. Zur Detektion der aufgetrennten DNA erfolgt eine 20 minütige Färbung des Gels im Ethidiumbromid-Bad (1 µg EtBr/ml). Hierbei interkaliert EtBr zwischen die Basen der doppelsträngigen DNA-Moleküle und kann, nach kurzem Spülen des Gels in Wasser, mittels UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm mit der Digitalkamera dokumentiert werden.

5.3.4.3 AUFREINIGUNG DER DNA-FRAGMENTE

Die im Zuge dieser Arbeit erzeugten PCR-Produkte und DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdau (vgl. 5.3.4.4, Seite 126) sowie aus ausgeschnittenen Agarosegelbanden werden mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit oder dem QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellervorschrift aufgereinigt. Lediglich der letzte Elutionsschritt der DNA erfolgt abweichend von der Vorschrift mit 50 µl bzw. 32 µl 2,5 mM Tris-Puffer.

Zusammensetzung des benötigten Puffers:

Tris-Puffer:	2,5 mM Tris
	pH 8,0 (HCl)

5.3.4.4 RESTRIKTIONSVERDAU

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen und können so gezielt DNA-Moleküle an diesen Stellen durch Spaltung einer chemischen Bindung schneiden. Der Restriktionsverdau von Plasmiden führt zu offenen, linearen DNA-Fäden, deren Größe mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 5.3.4.2, Seite 125) bestimmt werden kann. In dieser Arbeit wird der Restriktionsverdau sowohl zu analytischen als auch präparativen Zwecken für DNA-Klonierungen eingesetzt. Zur Verwendung kommen FastDigest-Enzyme der Firma Fermentas, deren Reaktionspuffer, auch bei einem Doppelverdau mit unterschiedlichen Enzymen, bereits aufeinander abgestimmt sind. In der Regel wird 1 µl des entsprechenden Enzyms/1 µg DNA eingesetzt. Der Verdau wird, wie im Herstellerprotokoll beschrieben, angesetzt. Die Inkubationszeit bei 37 °C beträgt jedoch abweichend von den Herstellerangaben zwischen 30 - 120 min. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgt durch 10 minütige Inkubation bei 80 °C und die eventuell erforderliche Aufreinigung der verdauten DNA wird entsprechend Abschnitt 5.3.4.3 auf Seite 125 durchgeführt. Beim Verdau mit dem Enzym XbaI gelten abweichende Reaktionsbedingungen, die der Herstellerbeschreibung zu entnehmen sind. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch 10 minütige Inkubation bei 65 °C.

5.3.4.5 DEPHOSPHORYLIERUNG DER DNA-FRAGMENTE

Um unerwünschte Religationen von Vektorfragmenten zu vermeiden, ist es im Zuge der Klonierungsarbeiten oft nötig eine Dephosphorylierung freier 5'-Enden der DNA-Moleküle durchzuführen. Dazu wird die entsprechende DNA nach folgendem Pipettierschema mit Antarktischer Phosphatase für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Pipettierschema zur Dephosphorylierung der DNA:

30 µl Ansatz:

26 µl	DNA
3 µl	10x Antarctic Phosphatase Puffer
1 µl	Antarktische Phosphatase

Anschließend muss die Probe zur Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 65 °C inkubiert werden. Die Aufreinigung erfolgt wie in Abschnitt 5.3.4.3 auf Seite 125 beschrieben mit dem NucleoSpin® Extract II Kit nach Herstellervorschrift.

5.3.4.6 LIGATION

Um PCR-Produkte (Abschnitt 5.3) oder durch Restriktionsverdau erhaltene und aufgereinigte DNA-Fragmente sowie Plasmide (Abschnitt 5.3.4.4) zu ligieren, wird die T4 DNA-Ligase verwendet. Die zu ligierenden Fragmente werden im Verhältnis 1:2 zu Gunsten des kleineren DNA-Bruchstücks nach folgendem Pipettierschema eingesetzt. Abweichend von den Herstellerangaben erfolgt die Ligation für mindestens 16 h bei Raumtemperatur. Abschließend wird das Gemisch für 10 min bei 65 °C thermisch inaktiviert. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Ligation wird stets eine Probe angesetzt, die nur das Vektor-Fragment, nicht aber das Insert enthält.

Pipettierschema zur Ligation von DNA-Fragmenten:

Ligations-Ansatz (20 µl):	Kontroll-Ansatz (20 µl):
50 ng Vektor	50 ng Vektor
100 ng Insert	–
2 µl 10x T4 DNA-Ligase Puffer	2 µl 10x T4 DNA-Ligase Puffer
1 µl T4 DNA-Ligase	1 µl T4 DNA-Ligase
ad 20 µl H ₂ O _{dd}	ad 20 µl H ₂ O _{dd}

5.3.4.7 TRANSFORMATION VON *Escherichia coli*

50 µl ultra-kompetente Zellen (vgl. 5.4.2, Seite 128) werden auf Eis angetaut und mit 1 - 50 ng der einzubringenden Plasmid-DNA, bzw. des jeweiligen Ligationsansatzes versetzt. Das Volumen der zugefügten DNA-Lösung beträgt dabei maximal 5% des Gesamtansatzvolumens für XL1-Blue Zellen (10%, KRX). Es erfolgt eine 30 minütige Inkubation auf Eis (10 min, KRX) woraufhin die Zellen für 90 sec (20 sec, KRX) einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt werden. Anschließend werden sie 2 min auf Eis abgekühlt, mit 800 µl (450 µl, KRX) SOC-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C, 225 rpm inkubiert, um den Selektionsmarker zu exprimieren. Von dieser Suspension werden 20 - 100 µl auf Agarplatten, welche das entsprechende Antibiotikum enthalten, ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C kopfüber inkubiert. Mit je einer der gewachsenen, isolierten Kolonien können nun Übernachtskulturen angeimpft oder eine Kolonie-PCR (5.3.2, Seite 123) durchgeführt werden.

5.3.4.8 MINIPRÄPARATION DER PLASMID-DNA

Zur Isolierung doppelsträngiger DNA für präparative und analytische Zwecke wird das maxX-bond™Kit der Firma AppliChem verwendet. Dazu werden 5 - 6 ml der entsprechenden *E. coli* Übernachtskultur eingesetzt und nach Herstellervorschrift aufgearbeitet. Abweichend vom Isolierungsprotokoll erfolgt die DNA-Elution im letzten Protokollschritt jedoch mit 60 µl 2,5 mM Tris-HCl-Lösung, pH 8,0 (siehe 5.3.4.3 auf Seite 125). Konzentration und Reinheit der isolierten DNA werden wie unter 5.3.4.1, Seite 125 beschrieben bestimmt.

5.3.4.9 MAXIPRÄPARATION DER PLASMID-DNA

Die Isolierung der DNA erfolgt mit dem JETSTAR Plasmid Purification Kit nach Vorschrift des Herstellers. Abweichend dazu wird der Isolierungsansatz in Schritt 9 zur Präzipitation der DNA über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und am nächsten Tag auf Eiswasser aufgetaut. Die nach Beendigung des Protokolls resultierenden Pellets werden in je $250\text{ }\mu\text{l}$ $2,5\text{ mM}$ Tris-HCl-Lösung, pH 8,0 (siehe 5.3.4.3 auf Seite 125) resuspendiert und Konzentration und Reinheit der isolierten DNA werden wie unter 5.3.4.1, Seite 125 beschrieben bestimmt.

5.3.4.10 DNA-SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung der DNA-Proben erfolgt am Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserslautern. Pro Sequenzierdurchgang sind $1\text{ }\mu\text{g}$ DNA der Konzentration $50\text{ - }200\text{ ng}/\mu\text{l}$ sowie die entsprechenden Sequenzierprimer in einer Konzentration von $10\text{ pmol}/\mu\text{l}$ erforderlich.

5.4 Biochemische Methoden

5.4.1 Sterilisation von Geräten

Die für die sterilen Arbeitsschritte erforderlichen Gerätschaften wurden durch Autoklavieren entkeimt. Nicht autoklavierbare Gegenstände wurden mit alkoholischer Lösung (70%iges Ethanol-Wasser-Gemisch) desinfiziert.

5.4.2 Herstellung ultra-kompetenter Zellen

Um die gewünschten, zumeist nicht bakterieneigenen Proteine in *E. coli* zu exprimieren, ist es erforderlich, die fremde für das jeweilige Protein codierende DNA in Form von Plasmiden in die Bakterienzellen einzuschleusen. Dazu ist es notwendig, die Zellen kompetent, d.h. aufnahmefähig für die Plasmide zu machen. In dieser Arbeit wird dafür die Methode nach Inoue (Inoue *et al.*, 1990) und die von Hanahan (Hanahan, 1983) beschriebenen Medien verwendet.

Zusammensetzung des benötigten Puffers:

Transformations- (TB-)Puffer:	10 mM Pipes
	15 mM CaCl_2
	250 mM KCl
	pH 6,7 (KOH)
	55 mM MnCl_2 zugeben
	steril filtrieren ($0,45\text{ }\mu\text{m}$ -Filter),
	Lagerung $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Durchführung:

Es werden Verdünnungsausstriche der entsprechenden *E. coli*-Stämme XL1-Blue oder KRX auf antibiotikafreien LB-Agarplatten angefertigt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 250 ml SOB-Medium werden am darauffolgenden Tag mit 10 - 12 isolierten Kolonien in einem 2 l Kolben inokuliert und die Kultur wird unter leichtem Schütteln bei 20 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Das Zellwachstum wird durch 10 minütige Inkubation auf Eis gestoppt und anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 2 500x g, 4 °C) geerntet. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 80 ml eisgekühltem TB-Puffer resuspendiert, erneut 10 min auf Eis inkubiert und unter selbigen Bedingungen abzentrifugiert. Es folgt ein erneutes Resuspendieren in 20 ml eiskaltem TB-Puffer und DMSO wird unter leichtem Schütteln bis zu einer Endkonzentration von 7% zugesetzt. Die Zelllösung wird nochmals 10 min auf Eis inkubiert, zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und letztlich bei – 80 °C gelagert.

5.4.3 Glycerinkulturen

Zum Anlegen von Glycerinkulturen wird ein 500 µl Aliquot der jeweiligen Übernachtskultur mit dem gleichen Volumen an Glycerin durch sanftes Verkippen durchmischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auch dort gelagert.

Zur Kultivierung von Einzelkolonien werden Verdünnungsausstriche mit Hilfe einer Impföse durch vorsichtiges Verstreichen einer kleinen abgekratzten Menge der gefrorenen Glycerinkulturen auf LB-Agarplatten angefertigt. Um eine lange Lebensdauer der Glycerinkulturen zu gewährleisten, muss ein Auftauen der Kulturen vermieden werden. Die LB-Agarplatten werden über Nacht kopfüber bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

5.4.4 Expression und Isolierung von SecB**5.4.4.1 AUFZUCHT UND LYSE DER ZELLEN**

Es werden Verdünnungsausstriche der jeweiligen SecB-Mutanten aus Glycerinkulturen auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten angefertigt, die über Nacht bei 37 °C inkubiert werden.

Mit je einer der gewachsenen, isolierten Kolonien werden nun ampicillinhaltige 2xYT-Nährmedien angeimpft und 16 h bei 37 °C, 275 rpm inkubiert.

Mit 7,5 ml dieser Übernachtskulturen werden nun die *large-scale* Kulturen inokuliert und bei 37 °C, 275 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 inkubiert. Dabei ist darauf zu achten, dass die verwendeten Gefäße nur bis maximal 25% befüllt werden, um eine ausreichende Belüftung der Kulturen zu gewährleisten. Daraufhin wird die Inkubationstemperatur auf 15 - 20 °C reduziert und die Zellen wachsen bei 275 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6. Anschließend erfolgt

die Induktion mit einer Endkonzentration von 0,1% Rhamnose und die Inkubation wird unter gleichen Bedingungen über Nacht fortgesetzt.

Das Zellwachstum der Kulturen wird durch 15 minütige Inkubation auf Eis gestoppt. Die Trennung der Zellen vom Nährmedium erfolgt sukzessiv durch 10 minütige Zentrifugation bei 4420x g, 4 °C. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet zum Waschen in 25 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen. Die Zellen werden erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und das resultierende Pellet in 20 ml Resuspendierungspuffer gelöst.

Die KRX-Zellen werden mittels Ultraschall im Eisbad aufgeschlossen (12 x 10 sec Puls, 20 sec Pause). Um das Zelllysate von Zelltrümmern und Schwebstoffen zu befreien, erfolgt eine 20 minütige Zentrifugation bei 18 900x g, 4 °C, gefolgt von einer 45 minütigen Zentrifugation des Überstands bei 184 000x g, 4 °C. Das klare Lysat wird in 3 ml Aliquots schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

Zusammensetzung des benötigten Puffers:

Resuspendierungspuffer:	150 mM NaCl
	20 mM Tris
	pH 7,4 (HCl)

5.4.4.2 AUFREINIGUNG VON SEC-B MITTELS NICKEL-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Bei diesem Aufreinigungsverfahren wird sich die hohe Affinität des 6x His-Tags zu Ni²⁺-Ionen, welche am verwendeten Säulenmaterial immobilisiert sind, zunutze gemacht.

Zusammensetzung der benötigten Puffer:

Waschpuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	20 mM Imidazol
	pH 7,4 (NaOH)

Elutionspuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	500 mM Imidazol
	pH 7,4 (HCl)

Durchführung:

3 ml Zelllysate werden mit 1,5 ml Nickel-NTA-Agarose unter leichtem Schütteln bei 4 °C für 2 h inkubiert. Dabei tritt der 6x His-Tag mit den Nickel-Ionen in Wechselwirkung. Nach der Inkubation wird die Mischung in eine verschlossene Chromatographie-Hülse (Bio-Rad) gefüllt. Hat sich das Säulenmaterial gesetzt, wird der Auslass geöffnet. Der Durchfluss, sowie alle folgenden Wasch- und Elutionsfraktionen werden zur späteren Charakterisierung aufgefangen. Unspezifisch

gebundene Proteine werden durch zweimaliges Waschen mit jeweils 4 ml Waschpuffer von der Säule entfernt. Die Elution von SecB erfolgt achtmal mit je 0,5 ml Elutionspuffer. Dabei färbt sich das gelbliche Säulenmaterial blau.

Jeweils 10 µl der gesammelten Fraktionen werden mittels SDS-PAGE analysiert, um die SecB-haltigen Fraktionen zu ermitteln.

5.4.4.3 DIALYSE VON SEC B

Um Imidazol, welches die spätere Thrombinspaltung stören würde, aus der Reaktionsmischung zu entfernen, werden die SecB-haltigen Fraktionen einer Dialyse unterworfen. Dazu werden die Fraktionen vereinigt und in einen zuvor in H₂O_{dd} inkubierten Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 14 kDa gefüllt. Um ein Ausflocken des Proteins während der Dialyse zu vermeiden, wird es mit wenigen Millilitern Dialysepuffer verdünnt. Die Dialyse erfolgt zweimalig über Nacht unter leichtem Rühren bei 4 °C gegen jeweils 5 l Dialysepuffer.

Zusammensetzung der benötigten Lösung:

Dialysepuffer:	200 mM NaCl
	20 mM Tris
	pH 7,4 (HCl), einstellen bei 4 °C

5.4.4.4 THROMBINSPALTUNG VON SEC B

Das SecB-haltige Dialysat wird steril filtriert (0,45 µm-Filter) und die Konzentration an SecB mittels BCA-Test bestimmt (vgl. 5.2.1.2, Seite 119).

Zur Abspaltung des 6x His-Tags wird die Lösung mit 10x Cleavage-Puffer des Thrombin-Kits versetzt und 1 U Thrombin (1,44 U/µl) pro 1 mg SecB zugesetzt. Ein Rest ungespaltenes SecB wird für die spätere Charakterisierung mittels SDS-PAGE zurückgehalten, um den Erfolg der Thrombinspaltung zu verifizieren. Die Inkubation erfolgt 16 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur.

Um SecB vom abgespaltenen 6x His-Tag und Thrombin zu befreien, wird der Spaltansatz in einen 50 kDa VivaSpin Konzentrador überführt, bei 4 000x g, 4 °C zentrifugiert und dabei sukzessiv fünfmal mit wenigen Millilitern Dialysepuffer, dem 0,1 mM PMSF zugesetzt werden, gewaschen. Das gewünschte, von 6x His-Tag und Thrombin befreite SecB befindet sich anschließend im Überstand.

Die Proteinkonzentration wird mittels BCA-Test bestimmt und Reinheit sowie Erfolg der Spaltung werden mittels SDS-PAGE kontrolliert, indem vergleichend ungespaltenes Protein mit aufgetragen wird. Das restliche Protein wird aliquotiert, schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

5.4.5 Expression und Isolierung von optimiertem His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈

5.4.5.1 AUFZUCHT UND LYSE DER ZELLEN

Die Zellaufzucht und -lyse erfolgen unter gleichen Bedingungen analog der Vorschrift für SecB (siehe 5.4.4.1, Seite 129).

Nach der Zelllyse durch Ultraschall und anschließender Zentrifugation befindet sich His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈, welches in *inclusion bodies* eingeschlossen wird, im resultierenden Pellet.

5.4.5.2 AUFSCHLUSS VON *Inclusion Bodies*

Der Zentrifugationsüberstand wird verworfen und der Aufschluss der *inclusion bodies* erfolgt durch Inkubation des resuspendierten Pellets mit 15 ml Denaturierungspuffer über Nacht bei 4 °C, 2 rpm. Am nächsten Tag ist die zuvor trübe Suspension klar geworden und wird 40 min bei 130 000x g, 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer und Schwebstoffe von dem sich nun im Überstand befindenden His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ abzutrennen. Der Überstand wird in 3 ml Aliquots schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

Zusammensetzung der benötigten Lösung:

Denaturierungspuffer:	6 M Gdn-HCl
	200 mM NaCl
	20 mM Tris
	5% Glycerin
	pH 7,4 (HCl)

5.4.5.3 AUFREINIGUNG VON HIS₆^T-ALL-ALA-BPTI₁₋₅₈ OPTIMIERT MITTELS NICKEL-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

3 ml Zelllysate werden wie unter 5.4.4.2, Seite 130 beschrieben mit 1,5 ml Nickel-NTA-Agarose inkubiert und wie zuvor beschrieben chromatographisch aufgearbeitet. Der Waschschrift erfolgt jedoch zweimal mit je 4 ml Waschpuffer 50 und zweimal mit je 4 ml Waschpuffer 100. Die Elution von His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ erfolgt achtmal mit je 1 ml Elutionspuffer (vgl. 5.4.4.2, Seite 130).

Zusammensetzung der benötigten Puffer:

Waschpuffer 50:	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	50 mM Imidazol
	pH 7,4 (NaOH)

Waschpuffer 100:	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	100 mM Imidazol
	pH 7,4 (HCl)

5.4.5.4 LYOPHILISIEREN

Die vereinigten His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈-haltigen Fraktionen werden fünfmal mit wenigen Millilitern Dialysepuffer (siehe Seite 131), welcher mit 0,1 mM PMSF versetzt wurde, mittels Ultrafiltration (3 000 MWCO, 4 000x g, 4 °C) gewaschen und aufkonzentriert.

Im Anschluss daran wird der Puffer der Proteinlösung mittels PD-10 Säule nach Vorschrift des Herstellers gegen den flüchtigeren Triethylammonium-Hydrogencarbonatpuffer ausgetauscht und die proteinhaltige Lösung lyophilisiert. Es resultiert ein weißer, pudriger Feststoff, der zur weiteren Verwendung in 100 mM NaOH aufgenommen, schockgefroren und bei – 80 °C gelagert wird. Da His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ ohne weitere Renaturierung aus den *inclusion bodies* isoliert wurde, befindet sich das Protein bereits in einem bindungskompetenten Zustand und kann sofort für die Komplexbildung mit SecB eingesetzt werden.

Zusammensetzung der benötigte Lösung:

Triethylammonium-Hydrogencarbonatpuffer:	10 mM NEt ₃ HCO ₃
	pH 7,4 (mit CO ₂ einstellen)

5.5 Immunologische Methoden

5.5.1 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay basiert auf der festen Bindung vieler Proteine an Kunststoffoberflächen, wie z.B. Polystyrol. Diese können dann mit Hilfe spezifischer Antikörper, z.B. durch eine enzymatische Farbreaktion, nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wird dieser Nachweis im „Sandwich“-Verfahren erbracht. Hierbei wird das Antigen indirekt, durch einen Sekundär-Antikörper, an dem ein Enzym als Indikator gebunden ist, nachgewiesen. Dieser bindet an den gegen ihn gerichteten Primär-Antikörper, welcher wiederum das trägergebundene Antigen besetzt (Richter, 2003).

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5.1.14 auf Seite 118 aufgeführt. Die Durchführung der Versuche erfolgt in angepasster Form nach dem Biochemischen Praktikumsskript (Trommer, 2007).

5.6 Chemische Modifizierungen

5.6.1 Carboxyamidomethylierung (CAM)

Um einen translokationskompetenten Zustand bei kommerziell erworbenen BPTI zu imitieren, müssen die im BPTI enthaltenen Disulfidbrücken aufgebrochen und blockiert werden, um eine Rückfaltung des Proteins zu vermeiden. Dies kann mittels Carboxyamidomethylierung realisiert werden.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen:

Puffer 1:	50 mM Tris pH 8,0 (HCl)
Puffer 2:	150 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,4 (HCl)

Durchführung:

Es wird eine Lösung kommerziellen BPTIs der Konzentration 2 mg/ml in Puffer 1 angesetzt. Um das Protein zu entfalten, werden 10,8 mmol Gdn-HCl zu 500 µl dieser Lösung gegeben und mit Puffer 1 auf 2 ml aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wird für 2 h, 6 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wird das Gemisch mit einer Endkonzentration von 10 mM DTT versetzt und es erfolgt eine weitere Inkubation von 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Zur Modifizierung der Cysteine erfolgen die Zugabe einer Endkonzentration von 25 mM Iodacetamid und eine 20 minütige Inkubation, ebenfalls im Dunkeln bei Raumtemperatur. 2,5 ml des carboxyamidomethylierten BPTI werden auf eine mit Puffer 2 äquilibrierte PD-10 Säule aufgetragen und nach Herstellerangaben eluiert, um nicht umgesetzte Reagenzien abzutrennen. Die proteinhaltigen Fraktionen werden mit Hilfe von Bradford-Reagenz ermittelt und anschließend vereinigt. Die Konzentration des cam-BPTI wird mittels BCA-Test (vgl. 5.2.1.2, Seite 119) bestimmt.

Wichtig zur Durchführung dieser Reaktion ist die Verwendung von frischem Iodacetamid, welches anhand seiner weißen Farbe erkennbar ist. Des Weiteren sollte die Inkubationszeit von 20 min im letzten Reaktionsschritt nicht überschritten werden, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden.

5.6.2 Fluoreszenzlabeling mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Zur Fluoreszenzmarkierung des carboxyamidomethylierten BPTI (cam-BPTI) mittels Fluoresceinisothiocyanat (FITC) wird im Anschluss an die 20 minütige Inkubation des BPTI mit

Iodacetamid im Abschnitt „Carboxyamidomethylierung“ (5.6.1, Seite 134) der pH-Wert der Reaktionslösung mittels 1 M NaOH auf 8,5 erhöht, um die im BPTI enthaltenen Lysine für die Folgereaktion zu deprotonieren. Es erfolgen die Zugabe von 10 mM FITC (Endkonzentration) sowie eine 30 minütige Inkubation des Reaktionsgemischs bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wird das cam-FITC-BPTI zur Abtrennung nicht umgesetzter Reagenzien analog 5.6.1, Seite 134 über eine mit Puffer 2 äquilibrierte PD-10 Säule aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels BCA-Test (vgl. 5.2.1.2, Seite 119).

5.6.3 Site-directed Spinlabeling mit MTS

Das Spinlabeling der SecB-Mutanten erfolgt nach modifizierter Vorschrift von Crane (Crane *et al.*, 2005).

Zusammensetzung der benötigten Lösungen:

Puffer SL 1:	10 mM HEPES 300 mM KAc pH 6,7
Puffer SL 2:	10 mM HEPES 300 mM KAc 5 mM Mg(Ac) ₂ pH 6,7

Durchführung:

Üblicherweise werden 500 - 800 mM (Monomer Konzentration) der jeweiligen SecB-Mutante unter leichtem Schütteln mit 10 mM DTT (Endkonzentration) für 2 - 3 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssiges Reduktionsmittel abzutrennen, wird das Reaktionsgemisch auf eine mit Puffer SL 1 äquilibrierte PD-10 Säule aufgetragen und nach Herstellervorschrift eluiert. Die Konzentration der vereinigten proteinhaltigen Fraktionen wird mittels BCA-Test (vgl. 5.2.1.2, Seite 119) bestimmt und ein 25-facher Überschuss an MTS-Spinlabel zugesetzt. Die Reaktionslösung wird bei 4 °C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Um den nicht umgesetzten Überschuss an Spinlabel abzutrennen, wird die Lösung erneut über eine mit Puffer SL 2 äquilibrierte PD-10 Säule aufgereinigt. Die proteinhaltigen Fraktionen werden vereinigt, durch Ultrafiltration (10 000 MWCO) bei 4 000x g, 4 °C aufkonzentriert und die Konzentration wird mittels BCA-Test bestimmt. Die Lagerung der spinlabelten SecB-Mutanten erfolgt bei – 80 °C.

5.7 Massenspektrometrische Methoden

5.7.1 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

Mit Hilfe der MALDI-ToF MS-Analyse ist es möglich, den Erfolg chemischer Modifizierungen von Proteinen (vgl. 5.6, Seite 134) zu verifizieren.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen:

Wetting-Solution:	100% Acetonitril
Equilibration-Solution:	0,1% Trifluoressigsäure
SA-Matrix:	500 µl Trifluoressigsäure (0,1%) 250 µl Acetonitril (100%) 10 - 12 mg Sinapinsäure 5 min Ultraschall, abzentrifugieren

Durchführung:

Die Probenvorbereitung erfolgt mittels Zip-Tip® Spitzen nach Angaben des *Zip-Tip® User Guide for Reversed Phase*. Die so aufbereiteten Proben werden sofort im Anschluss auf ein Anchor Chip Target® nach der *dried droplet*-Methode mit gesättigter Sinapinsäure als Matrixlösung (SA-Matrix) aufgetragen.

Die vor den eigentlichen Messungen durchgeführte Kalibrierung erfolgt mit dem Protein Calibration Standard I, der die Massendetektion in einem Bereich von 4 - 20 kDa gestattet. Die Aufzeichnung der Spektren erfolgt nach dem LinToF-Verfahren im positiven Messbereich des Massenspektrometers bei einer Beschleunigungsspannung von 25 kV und unter Verwendung der internen Programmroutine LP_12kDa_25kV_britta.par.

5.7.2 Electrospray Ionization (ESI)

5.7.2.1 TRYPTISCHER VERDAU

Die zu analysierenden Gelbanden der SDS-PAGE (5.2.2, Seite 120) werden in 1 - 2 mm breite Stücke geschnitten und abwechselnd dreimal mit Lösung A und Lösung B gewaschen. Der tryptische In-Gel Verdau erfolgt über Nacht durch Inkubation der Gelstücke mit 4 µl Trypsinlösung der Konzentration 25 µg/ml bei 37 °C.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen:

Lösung A:	50 mM Ammonium-Hydrogencarbonat
Lösung B:	50% (v/v) Lösung A 50% (v/v) Acetonitril

5.7.2.2 ESI-MS/MS-MESSUNG

Im Anschluss an den tryptischen Verdau wird die Probe durch 15 minütige Inkubation im Ultraschallbad unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur in 10 µl Lösung C extrahiert. Der Überstand jeder extrahierten Probe wird in eine Glasküvette überführt und der Extraktionsschritt wiederholt, um höhere Ausbeuten zu erzielen. Das Lösungsmittel der vereinigten Extrakte jeder Probe wird in der SpeedVac auf ein Gesamtvolumen von 8 µl eingeengt und man erhält eine Lösung mit einem Gehalt von 5% Ameisensäure.

Die Trennung und Analyse der tryptisch verdauten Peptide wird durch eine Kombination aus Nanoscale Reversed-Phase Flüssigchromatographie und ESI-MS realisiert. Zuerst wird eine stetige Reversed-Phase Capillary HPLC Trennung mittels Nano-LC unter Anwendung eines Gradienten-Programms mit Puffer A und B durchgeführt. Dazu werden die Peptide zuerst auf einer Symmetry300 C18 Trapping Säule durch 6 minütiges Spülen mit Waschpuffer bei einer Flussrate von 10 µl/min aufkonzentriert und gereinigt. Bei der stetigen LC Trennung wird zuerst ein Gradient von 5 - 60% Pumpenleistung B über einen Zeitraum von 74 min und dann von 60 - 100% Pumpenleistung B in 10 min gefahren, gefolgt von weiteren 6 min bei 100% B. Die Flussrate der Pumpen A und B beträgt 4 µl/min und wird aufgeteilt, um die Flussrate durch die NanoEase Trennsäule auf 200 nl/min zu reduzieren. Im Anschluss daran wird die ESI-MS/MS Analyse durchgeführt. Die datenabhängige Analyse, welche die drei am häufigsten vorkommenden Ionen jedes Durchlaufs umfasst, wird mit den folgenden Parametern durchgeführt: 1 sec MS /m/z 400 - 1 600 und 3 sec MS/MS m/z 100 - 1 600 im kontinuierlichen Modus mit 60 sec dynamic exclusion. Des Weiteren beträgt die Konusspannung 40 V, die Kapillarspannung 2,0 - 2,4 kV und der Peak-Detektionsbereich 1 Da. Die gewählten Ladungszustände betragen 1⁺, 2⁺, 3⁺, 4⁺ und die Kollisionsenergie ist abhängig vom jeweiligen Ladungszustand.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen:

Lösung C:	2,5% Ameisensäure 50% Acetonitril
Puffer A:	0,1% Ameisensäure 5% Acetonitril 94,9% H ₂ O _{dd} (v/v/v)

Puffer B:	0,1% Ameisensäure 5% H ₂ O _{dd} 94,9% Acetonitril (v/v/v)
Waschpuffer:	0,1% Ameisensäure 99,9% H ₂ O _{dd} (v/v)

5.7.2.3 DATENBANKSUCHE

Die Rohdaten werden mit MassLynx 4.0 gesammelt und die Verarbeitung der Daten erfolgt mit ProteinLynx 2.1. Die resultierenden Daten werden durch Datenbanksuche gegen die SwissProt Database abgeglichen. Folgende Limitierungen werden bei der Mascot Suche getroffen: Zugelassen sind nur tryptisch verdaute Peptide mit bis zu zwei ausgelassenen Spaltungsstellen, des Weiteren Ladungszustände von 1⁺, 2⁺, 3⁺, 4⁺, eine Massentoleranz von 200 ppm für MS und 0,2 Da Toleranz für MS/MS Fragmentionen. Jede positive Zuordnung wird individuell analysiert und bestätigt, um falsche Identifizierungen auszuschließen.

5.8 Chromatographische Methoden

5.8.1 *High Performance (Pressure) Liquid Chromatography (HPLC)*

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) handelt es sich um ein analytisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Probe unter hohem Druck zusammen mit dem Eluent, welcher die mobile Phase verkörpert, durch eine Trennsäule, der stationären Phase, transportiert wird.

Als Laufmittel dient der unter 5.4.4.3, Seite 131 beschriebene Dialysepuffer, welcher zuvor über einen 0,22 µm-Filter von Schwebstoffen befreit und mittels Helium entgast wurde. Die verwendete Säule (5.1.3, Seite 111) weist einen linearen Arbeitsbereich von 10 - 250 kDa auf. Es werden konstante Flussraten von 0,5 - 1,0 ml/min bei zuvor äquilibrierter Säule eingestellt und Probenvolumina von 50 µl appliziert. Die Aufzeichnung der Spektren erfolgt über 40 min bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das Eluat wird zur weiteren Charakterisierung (TCA-Fällung, SDS-PAGE, Fluoreszenzmessung) in 500 µl Fraktionen aufgefangen.

5.9 Spektroskopische Methoden

5.9.1 Konfokale *Laser Scanning* Mikroskopie (LSM)

Zum Nachweis einer erfolgreichen Proteinexpression in *E. coli* besteht die Möglichkeit, das zu exprimierende Zielgen mit der Gensequenz des *Green Fluorescent Protein*, GFP, spezifisch zu fusionieren. Das so im Zuge der Translation ebenfalls gebildete GFP, welches bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert, kann dann durch Anregung mit einem Argon-Laser bei 488 nm durch seine Emission bei 509 nm detektiert werden.

5.9.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Von jeder fluorimetrisch zu vermessenden Probe werden UV-Spektren aufgezeichnet, aus deren Absorptionsmaxima die Anregungswellenlänge λ_{Ex} für die Fluoreszenzmessung bestimmt wird. Das hierzu eingesetzte Probenvolumen beträgt 3,5 ml und die Messungen erfolgen in Quarzglas-*küvetten* der Schichtdicke 1 cm über einen Scanbereich von 200 - 700 nm. Die Schrittweite beträgt 0,1 nm, die Integrationszeit 0,2 sec und die Bandbreite 1 nm.

Die Messung der Fluoreszenz wird mit 0,5 ml Probenvolumen in Mikroquarzglas-*küvetten* der Dimension 2 mm x 1 cm durchgeführt. Die Aufzeichnung der Spektren erfolgt ausgehend von einem variablen Startpunkt und endet bei 750 nm. Die Schrittweite beträgt 1 nm, die Integrationszeit 0,1 sec und die Bandbreite 2,5 nm. Alle Messungen werden bei 25 °C durchgeführt.

5.9.3 *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR)

5.9.3.1 *Continuous Wave*-EPR MESSUNGEN (X-BAND)

Die EPR-Messungen im X-Band Bereich wurden in Karlsruhe, Bruker BioSpin mit dem Spektrometer EMX Plus und der High-Q Cavity unter Verwendung von Quarzkapillaren mit 1 mm Innendurchmesser aufgezeichnet. Gemessen wird bei einer Temperierung von 308 K sowie unter Stickstoffkühlung bei 150 K. Die Scanbreite der Messungen beträgt 200 G und die Spektren werden als Mittelwert aus 20 Scans erhalten. Die weiteren Messparameter sind in Tabelle 5.9.1, Seite 140 aufgelistet. Die Vorbereitung der MTS-gelabelten Proben erfolgt in Aliquots zu 50 μl in 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 in verschlossenen Quarzkapillaren, die sofort vor der Tieftemperaturmessung in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden.

Tab. 5.9.1: Parameter der durchgeführten X-Band CW-EPR Messungen.

Parameter	308 K	150 K
Centerfield [G]	3336	3336
Width [G]	200	200
Points	1024	1024
Field Mod. Amplitude	0,0005	0,0005
Field Mod. Frequency [kHz]	100	100
Microwave Power [mW]	4	0,25
Microwave Frequency [GHz]	9,37	9,37
Receiver Gain [dB]	50	50
Receiver Time Constant [ms]	1,28	1,28
Number of Scans	20	20
Sampling Time [s]	0,02	0,02

5.9.3.2 ESE-DETEKTIERTE HOCHFELD-EPR MESSUNGEN (W-BAND)

Die ESE-detektierten EPR Messungen sowie die im nachfolgendem Abschnitt behandelten DEER Messungen wurden am MPI für Polymerforschung in Mainz im Arbeitskreis Spiess durchgeführt.

Die Elektronen Spin Echo (ESE)-detektierten EPR Messungen werden im W-Band bei 20 K unter Heliumkühlung durchgeführt. Die Proben werden mittels Hamilton Spritze bis zu einer Füllhöhe von etwa 1 cm in selbst hergestellte CFQ-Quarz Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,7 mm eingefüllt und bei 50 K in den Resonator eingesetzt. Nachdem das magnetische Feld bei der EPR Messung durchlaufen wurde, werden die ESE-detektierten EPR-Spektren durch Integration der Intensität des Zwei-Puls Echos, welches als Funktion der Feldposition aufgezeichnet wird, aufgenommen. Die Pulssequenz der ESE-detektierten Messung lautet: $\frac{\pi}{2} - \tau - \pi - \text{Echo}$ und die Pulslängen liegen bei $t_{\pi/2} = 48 \text{ ns}$ und $t_{\pi} = 96 \text{ ns}$ mit einer zeitlichen Verzögerung von $\tau = 252 \text{ ns}$ zwischen den Pulsen. Die Integrator-Bandbreite beträgt 200 nm. Anstelle der herkömmlichen CW-EPR-Detektion wird durchweg die ESE-Detektion verwendet, da die so erhaltene spektrale Baseline frei von Artefakten ist und eine deutlich höhere Langzeitstabilität aufweist.

Analyse der Daten:

Die Background Korrektur der in dieser Arbeit abgebildeten EPR-Spektren wird mit eigens dafür von der Arbeitsgruppe „EPR Spectroscopy & Self-Organization of Soft Matter by Non-Covalent Interactions“ um Dr. Dariush Hinderberger am MPIP Mainz geschriebenen Matlab Programm vorgenommen. Das pseudomodulierte ESE-Spektrum wird ebenfalls durch ein vom MPIP Mainz geschriebenes Matlab Programm unter Einbindung des Easyspin Programm Pakets

mit einer Modulationsamplitude von 0,6 mT aus dem Absorptionsspektrum erhalten. Durch Vergleich verschiedener Werte der Modulationsamplituden wird sorgfältig überprüft, dass die Modulationsamplitude zu keiner spektralen Verbreiterung führt. Alle Spektren werden mit dem Matlab-basierenden Easyspin 3.0.0 Software Paket simuliert.

5.9.3.3 Double Electron-Electron Resonance (DEER)-MESSUNGEN

Das angesetzte Gesamtvolumen für die DEER-Messungen beträgt 80 μl , von denen 20 Vol% an Glycerin zugesetzt werden, um ein Auskristallisieren der Probe während des Einfrierens zu vermeiden. Die Proben werden in Quarzkapillaren mit einem 3 mm Außendurchmesser gefüllt und in *iso*-Pentan, welches in einem Bad aus flüssigem Stickstoff gekühlt ist, schockgefroren.

Die Aufzeichnung der Daten der dipolaren Evolutionszeit erfolgt bei X-Band Frequenzen von 9,2 - 9,4 GHz unter Anwendung des 4-Puls DEER-Experiments (Pannier *et al.*, 2000; Jeschke *et al.*, 2000): $\frac{\pi}{2}(\nu_{\text{obs}}) - \tau_1 - \pi(\nu_{\text{obs}}) - (\tau_1 + t)(\nu_{\text{pump}}) - (\tau_2 - t) - \pi(\nu_{\text{obs}}) - \tau_2 - \text{Echo}$. Die dipolare Evolutionszeit t wird variiert, wobei τ_1 und τ_2 konstant gehalten werden. Die gemittelte Protonenmodulation wird durch Summation der acht Zeitspuren der Variablen τ_1 , beginnend bei $\tau_{1,0} = 200$ ns unter Verwendung der Inkrementzeit $\Delta\tau_1 = 8$ ns erhalten (Jeschke *et al.*, 2004a). Die Überkopplung des Resonators wird zu einem Wert von $Q \approx 100$ gewählt. Die Pumpfrequenz ν_{pump} wird auf das Maximum des EPR-Spektrums eingestellt. Die Observerfrequenz ν_{obs} wird auf $\nu_{\text{pump}} + 61,6$ MHz gesetzt, was mit dem lokalen Maximum des Tieffelds des Nitroxid-Spektrums übereinstimmt. Die Observer Pulslängen betragen sowohl für $\frac{\pi}{2}$ als auch für π 32 ns und die Länge des Pumpimpulses beträgt 12 ns. Durch Kühlung mit einem *closed cycle* Kryostaten wird die Temperatur auf 50 K reguliert. Die Messung der Proben erfolgt über Nacht.

Analyse der Daten:

Die Verarbeitung der DEER-Rohdaten der Zeitdomäne erfolgt mit dem Programmpaket Deer-Analysis2006 (Jeschke *et al.*, 2006). Intermolekulare Beiträge werden durch Division durch einen exponentiellen Abfall mit einer fraktalen Dimension von $d = 3,8$ entfernt. Die Abweichung von $d = 3,0$ stammt von Ausschlussvolumeneffekten, die von der Größe der Proteine herrühren. Die daraus resultierenden Zeitspuren werden normalisiert zu $t = 0$. Die Abstandsverteilungen werden durch Tikhonov Regulierung unter Verwendung der Regulierungsparameter 100 (16-DSA) und 1000 (5-DSA) erhalten.

Literatur

- AGILENT, Technologies: Agilent ZORBAX Bio Series GF-250. *Datasheet*. (2005), S. 1 – 4.
- AKDOGAN, Y.; HELLER, J.; ZIMMERMANN, H.; HINDERBERGER, D.: The solvation of nitroxide radicals in ionic liquids studied by high-field EPR spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12** (2010), S. 7874 – 7882.
- AKDOGAN, Y.; JUNK, M. J. N.; HINDERBERGER, D.: Effect of Ionic Liquids on the Solution Structure of Human Serum Albumin. *Biomacromolecules*. **12** (2011), S. 1072 – 1079.
- AMANN, R.: *Untersuchungen zur Komplexbildung von SecB mit seinem Modellsubstrat BPTI*, Technische Universität Kaiserslautern, Diplomarbeit, 2009.
- ANDERER, F. A.; HÖRNLE, S.: The disulfide linkages in kallikrein inactivator of bovine lung. *J. Biol. Chem.* **241** (1966), S. 1568 – 1572.
- ANDERSON, S.; KINGSTON, I. B.: Isolation of a genomic clone for bovine pancreatic trypsin inhibitor by using a unique-sequence synthetic DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80** (1983), S. 6838 – 6842.
- ANFINSEN, C. B.: Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. **181** (1973), S. 23 – 30.
- ANTONOAIA, R.; FÜRST, M.; NISHIYAMA, K.: The periplasmic chaperone PpiD interacts with secretory proteins exiting from the SecYEG translocon. *Biochemistry*. **47** (2008), S. 5649 – 5656.
- ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; BOLOGNESI, M.; SPALLAROSSA, A.; COLETTA, M.; DE CRISTOFARO, R.; MENEGATTI, E.: The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr. Protein Peptide Sci.* **4** (2003), S. 231 – 251.
- ATKINS, P. W.; HÖPFNER, A. (Hrsg.): *Physikalische Chemie*. 3. Auflage. Wiley-VCH; Weinheim, 2001. – URL <http://www.wiley-vch.de/publish/dt/books/ISBN978-3-527-31546-8>
- BANHAM, J. E.; TIMMEL, C. R.; ABBOTT, R. J. M.; LEA, S. M.; JESCHKE, G.: The Characterization of Weak Protein-Protein Interactions: Evidence from DEER for the Trimerization of a von Willebrand Factor A Domain in Solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006), S. 1058 – 1061.

- BASSFORD, P.; BECKWITH, J.; ITO, K.; KUMAMOTO, C.; MIZUSHIMA, S.; OLIVER, D.; RANDALL, L. L.; SILHAVY, T.; TAI, P. C.; WICKNER, B.: The primary pathway of protein export in *E. coli*. *Cell*. **65** (1991), S. 367 – 368.
- BENNATI, M.; ROBBLEE, J.; MUGNAINI, V.; STRUBBE, J.; FREED, J.; BORBAT, P.: EPR distance measurements support a model for long-range radical initiation in *E. coli* ribonucleotide reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005), S. 15014 – 15015.
- BENSADOUN, A.; WEINSTEIN, D.: Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70** (1976), S. 241 – 250.
- BERLINER, L. J.; EATON, G. R.; EATON, S. S.: *Biological Magnetic Resonance: Distance Measurements in Biological Systems by EPR*. Kluwer Academic; New York, 2000. – URL ISBN: 978-0306465338
- BERLINER, L. J.; GRUNWALD, J.; HANKOVSKY, H. O.; HIDEG, K.: A Novel Reversible Thiol Specific Spin Label: Papain Active Site Labeling and Inhibition. *Analytical Biochemistry*. **119** (1982), S. 450 – 455.
- BERLINER, L. J.; REUBEN, J.: *Spin Labeling Theory and Applications. Biological Magnetic Resonance*. Plenum Press; New York, 1989. – URL ISBN: 0-306-43072-X
- BLOBEL, G.; DOBBERSTEIN, B.: Transfer of proteins across membranes. *J. Cell. Biol.* **67** (1975), S. 835 – 851.
- BUCHNER, J.: Introduction: The cellular protein folding machinery. *Ce. Mol. Life Sci.* **59** (2002), S. 1587 – 1588.
- BULLOCK, W. O.; FERNANDEZ, J. M.: XL1-Blue - A High-Efficiency Plasmid Transforming RECA *Escherichia Coli* Strain with β -Galactosidase Selection. *Short J.M. Biotechniques*. **5** (1987), S. 376 – 379.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. **263** (1994), S. 802 – 805.
- CHEN, L.; TAI, P. C.: Evidence for the involvement of ATP co-translational protein translocation. *Nature*. **328** (1987), S. 164 – 166.
- COLLIER, D. N.: SecB: a molecular chaperone of *Escherichia coli* protein secretion pathway. *Adv. Protein Chem.* **44** (1993), S. 151 – 193.
- CRANE, J. M.; MAO, C.; LILLY, A. A.; SMITH, V. F.; SUO, Y.; HUBBELL, W. L.; RANDALL, L. L.: Mapping of the docking of SecA onto the chaperone SecB by site-directed spin labeling:

- Insight into the mechanism of ligand transfer during protein export. *J. Mol. Biol.* **353** (2005), S. 295 – 307.
- CUNNINGHAM, K.; LILL, R.; CROOKE, E.; RICE, M.; MOORE, K.; WICKNER, W.; OLIVER, D. B.: SecA protein, a peripheral protein of the *Escherichia coli* plasma membrane, is essential for the functional binding and translocation of proOmpA. *EMBO J.* **8** (1989), S. 955 – 959.
- DE VRIJE, T.; BATENBURG, A. M.; KILLIAN, J. A.; DE KRUIJFF, B.: Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **4** (1990), S. 143 – 150.
- DEKKER, C.; DE KRUIJFF, B.; GROS, P.: Crystal structure of SecB from *Escherichia coli*. *Journal of Structural Biology.* **144** (2003), S. 313 – 319.
- DEN BLAAUWEN, T.; DRIESSEN, A. J. M.: Sec-dependent preprotein translocation in bacteria. *Archives of Microbiology.* **165** (1996), S. 1 – 8.
- DIAMOND, D. L.; RANDALL, L. L.: Kinetic Partitioning. *Journal of Biological Chemistry.* **272** (1997), S. 28994 – 28998.
- DIAMOND, D. L.; STROBEL, S.; CHUN, S. Y.; RANDALL, L. L.: Interaction of SecB with intermediates along the folding pathway of maltose-binding protein. *Protein Sci.* **4** (1995), S. 1118 – 1123.
- DITTRICH, M.; KANCHANAWARIN, C.: Case Study: BPTI. *www.ks.uiuc.edu/Training.* (2011), S. 1 – 19.
- DOMINY, B. N.; BROOKS, C. L.: Development of a Generalized Born Model Parametrization for Proteins and Nucleic Acids. *J. Phys. Chem. B.* **103** (1999), S. 3765 – 3773.
- DOUVILLE, K.; PRICE, A.; EICHLER, J.; ECONOMOU, A.; WICKNER, W.: SecYEG and SecA are the stoichiometric components of preprotein translocase. *J. Biol. Chem.* **270** (1995), S. 20106 – 20111.
- DRIESSEN, A. J. M.: SecB, a molecular chaperone with two faces. *TRENDS in Microbiology.* **9** (2001), S. 193 – 196.
- DRIESSEN, A. J. M.; FEKKES, P.; VAN DER WOLK, J. P. W.: The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.* **1** (1998), S. 216 – 222.
- DUONG, F.; WICKNER, W.: Distinct catalytic role of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preproteintranslocase holoenzyme. *EMBO J.* **16** (1997), S. 2756 – 2768.
- FAJER, P. G.: Site directed spin labelling and pulsed dipolar electron paramagnetic resonance (double electron-electron resonance) of force activation in muscle. *J. Phys.: Condens. Matter.* **17** (2005), S. 1459 – 1469.

- FEKKES, P.; DE WIT, J. G.; VAN DER WOLK, J. P.; KIMSEY, H. H.; KUMAMOTO, C. A.; DRIESSEN, A. J.: Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the cooperative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Mol. Microbiol.* **29** (1998), S. 1179 – 1190.
- FEKKES, P.; DEN BLAAUWEN, T.; DRIESSEN, A. J.: Diffusion-Limited Interaction between Unfolded Polypeptides and the *Escherichia coli* Chaperone SecB. *Biochemistry.* **34** (1995), S. 10078 – 10085.
- FEKKES, P.; DRIESSEN, A. J. M.: Protein Targeting to the Bacterial Cytoplasmatic Membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **63** (1) (1999), S. 161 – 173.
- FEKKES, P.; VAN DER DOES, C.; DRIESSEN, A. J.: The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.* **16** (1997), S. 6105 – 6113.
- FÜRST, M.; MÜLLER, M.: Bakterielle Transportsysteme: Proteintranslokation über bakterielle Membranen. *Bio Spektrum.* **5** (2010), S. 508 – 512.
- GETHING, M.; SAMBROOK, J.: Protein folding in the cell. *Nature.* **355** (1992), S. 33 – 44.
- GOODSELL, D. S.: *Molecule of the Month: Trypsin.* RCSB PDB, 2003. – URL http://www.pdb.org/pdb/education_discussion/molecule_of_the_month/download/Trypsin.pdf
- GÖPEL, W.; ZIEGLER, C.: *Struktur der Materie: Grundlagen, Mikroskopie und Spektroskopie.* Teubner; Stuttgart, Leipzig, 1994. – URL <http://dx.doi.org/DOI:10.1002/bbpc.19940981228>
- GOURIDIS, G.; KARAMANOU, S.; GELIS, I.: Signal peptides are allosteric activators of the protein-translocation channel. *Nature.* **462** (2009), S. 363 – 367.
- GRIFFITH, O. H.; WAGGONER, A. S.: Nitroxide Free Radicals: Spin Labels for Probing Biomolecular Structure. *Accounts of Chemical Research.* **2** (1969), S. 17 – 24.
- HAHN, E. L.: Spin Echoes. *Physical Review.* **80** (1950), S. 580 – 594.
- HAIMANN, M. M.: *Proteinexport in Escherichia coli: Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen dem Export-Chaperon SecB und seinem Substrat preMBP mit Hilfe der ESR-Spektroskopie,* Technische Universität Kaiserslautern, Diplomarbeit, 2006.
- HAIMANN, M. M.; AKDOGAN, Y.; PHILIPP, R.; VARADARAJAN, R.; HINDERBERGER, D.; TROMMER, W. E.: Conformational changes of the chaperone SecB upon binding to a model substrate - bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). *Biol. Chem.* **392** (2011), S. 849 – 858.

- HAMIAUX, C.; PÉREZ, J.; PRANGÉ, T.; VEESLER, S.; RIÈS-KAUTT, M.; VACHETTE, P.: The BPTI decamer observed in acidic pH crystal forms pre-exists as a stable species in solution. *J. Mol. Biol.* **297** (2000), S. 697 – 712.
- HANAHAH, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology.* **166** (1983), S. 558 – 580.
- HARDY, S. J.; RANDALL, L. L.: Biochemical investigation of protein export in *Escherichia coli*. *J. Cell. Sci. Suppl.* **11** (1989), S. 29 – 43.
- HARDY, S. J. S.; RANDALL, L. L.: A Kinetic Partitioning Model of Selective Binding of Nonnative Proteins by the Bacterial Chaperone SecB. *Science.* **251** (1991), S. 439 – 443.
- HARTL, F.-U.: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* **381** (1996), S. 571 – 580.
- HARTL, F.-U.; LECKER, S.; SCHIEBEL, E.; HENDRICK, J. P.; WICKNER, W.: The binding of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* membrane. *Cell.* **63** (1990), S. 269 – 279.
- HARTNETT, J.; GRACYALNY, J.; SLATER, M. R.: The Single Step (KRX) Competent Cells: Efficient Cloning and High Protein Yields. *Protein Expression (Promega Corporation).* **94** (2006), S. 27 – 30.
- HILGER, D.; POLYHACH, Y.; PADAN, E.; JUNG, H.; JESCHKE, G.: High-resolution structure of a Na⁺/H⁺ antiporter dimer obtained by pulsed electron paramagnetic resonance distance measurements. *Biophys. J.* **93** (2007), S. 3675 – 3683.
- HOLTZHAUER, M.: *Biochemische Labormethoden, Arbeitsvorschriften und Tabellen.* Bd. 5 - 6. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 1988. – URL <http://dx.doi.org/doi:10.1002/food.19900340227>
- HOSSANN, M.: *Antigenspezifische Immunsuppression in einem Tiermodell der Myasthenia gravis*, Technische Universität Kaiserslautern, Dissertation, 2004.
- HUBBELL, W. L.; ALTENBACH, C.: Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4** (1994), S. 566 – 573.
- HUBBELL, W. L.; CAFISO, D. S.; ALTENBACH, C.: Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *Nat. Struct. Biol.* **7** (2000), S. 735 – 739.
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H.: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96** (1990), S. 23 – 28.

- JESCHKE, G.: *Einführung in die ESR-Spektroskopie - Skript zur Vorlesung von H. W. Spiess*. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 1998. – URL www.till-biskup.de/_media/de/forschung/epr/jeschke-esr.pdf
- JESCHKE, G.: Determination of the Nanostructure of Polymer Materials by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Macromol. Rapid Commun.* **23** (2002), S. 227 – 246.
- JESCHKE, G.: Distance measurements in the nanometer range by pulse EPR. *Chem. Phys. Chem.* **3** (2002), S. 927 – 932.
- JESCHKE, G.; BENDER, A.; PAULSEN, H.; H. ZIMMERMANN; GODT, A.: Sensitivity enhancement in pulse EPR distance measurements. *J. Magn. Reson.* **169** (2004), S. 1 – 12.
- JESCHKE, G.; CHECHIK, V.; IONITA, P.; GODT, A.; ZIMMERMANN, H.; BANHAM, J.; TIMMEL, C. R.; HILGER, D.; JUNG, H.: DeerAnalysis2006 - A Comprehensive Software Package for Analyzing Pulsed ELDOR Data. *Appl. Magn. Reson.* **30** (2006), S. 473 – 498.
- JESCHKE, G.; KOCH, A.; JONAS, U.; GODT, A.: Direct Conversion of EPR Dipolar Time Evolution Data to Distance Distributions. *J. Magn. Reson.* **155** (2002), S. 72 – 82.
- JESCHKE, G.; PANEK, G.; GODT, A.; BENDER, A.; PAULSEN, H.: Data Analysis Procedures for Pulse ELDOR Measurements of Broad Distance Distributions. *Appl. Magn. Reson.* **26** (2004), S. 223 – 244.
- JESCHKE, G.; PANNIER, M.; SPIESS, H. W.; BERLINER, L. J. (Hrsg.); EATON, G. R. (Hrsg.); EATON, S. S. (Hrsg.): *Biological Magnetic Resonance: Distance Measurements in Biological Systems by EPR*. Bd. 19. Kluwer Academic; New York, 2000. – URL http://www.springer.com/medicine/radiology/book/978-0-306-46533-8?cm_mmc=Google_-_Book%20Search_-_Springer_-_0
- JESCHKE, G.; POLYHACH, Y.: Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9** (2007), S. 1895 – 1910.
- JUNK, M. J. N.: *Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy*, Universität Mainz, Dissertation, 2010.
- JUNK, M. J. N.; SPIESS, H. W.; HINDERBERGER, D.: DEER in biological multispin-systems: A case study on the fatty acid binding to human serum albumin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49** (2010), S. 8755 – 8759.
- JUNK, M. J. N.; SPIESS, H. W.; HINDERBERGER, D.: The Distribution of Fatty Acids Reveals The Functional Structure of Human Serum Albumin. *Angewandte Chemie International Edition.* **49** (2010), S. 8755 – 8759.

- KADOKURA, H.; BECKWITH, J.: Detecting folding intermediates of a protein as it passes through the bacterial translocation channel. *Cell*. **138** (2009), S. 1164 – 1173.
- KHISTY, V. J.; MUNSKE, G. R.; RANDALL, L. L.: Mapping of the Binding Frame for the Chaperone SecB within a Natural Ligand, Galactose-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*. **270** (1995), S. 25920 – 25927.
- KIM, J.; KENDALL, D. A.: Sec-dependent protein export and the involvement of the molecular chaperone SecB. *Cell Stress Chaperones*. **5** (2000), S. 267 – 275.
- KIMSEY, H. H.; DAGARAG, M. D.; KUMAMOTO, C. A.: Diverse effects of mutation on the activity of the *Escherichia coli* export chaperone SecB. *J. Biol. Chem.* **270** (1995), S. 22831 – 22835.
- KOOLMAN, J.; RÖHM, K.-H.: *Taschenatlas der Biochemie*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York, 2003. – URL ISBN: 3-13-759402-2
- KRISHNAN, B.: *Biophysical characterization of interaction of SecB with MBP and preMBP: in vitro studies*, Indian Institute of Science, Dpt. of MBU, Dissertation, 2004.
- KRISHNAN, B.; KULOTHUNGAN, S. R.; PATRA, A. K.; UDGAONKAR, J. B.; VARADARAJAN, R.: SecB-mediated Protein Export Need Not Occur via Kinetic Partitioning. *J. Mol. Biol.* **385** (2009), S. 1243 – 1256.
- KRISHNAN, B.; UDGAONKAR, J. B.; VARADARAJAN, R.: Effect of signal peptide on the stability and folding kinetics of maltose binding protein. *Biochemistry*. **43** (2004), S. 3608 – 3619.
- KUMAMOTO, C. A.; BECKWITH, J.: Evidence for specificity at an early step in protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **163** (1985), S. 267 – 274.
- KUMAMOTO, C.A.: SecB protein: a cytosolic export factor that associates with nascent exported proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22** (1990), S. 337 – 351.
- KUNITZ, M.; NORTHROP, J. H.: Isolation From Beef Pancreas of Crystalline Trypsinogen, Trypsin, a Trypsin Inhibitor, and an Inhibitor-Trypsin Compound. *J. Gen. Physiol.* **19** (1936), S. 991 – 1007.
- LAEMMLI, U.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227** (1970), S. 680 – 685.
- LASKOWSKI JR., M.; KATO, I.: Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **49** (1980), S. 593 – 626.

- LECKER, S. H.; DRIESSEN, A. J.; WICKNER, W.: ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. *EMBO J.* **9** (1990), S. 2309 – 2314.
- LEINISCH, F.: *Proteinexport in Escherichia coli: Untersuchung der Wechselwirkungen verschiedener Proteine mit SecB mit Hilfe der ESR-Spektroskopie*, Technische Universität Kaiserslautern, Diplomarbeit, 2005.
- LEVINTHAL, C.: Are there Pathways for Proteinfolding?. *J. Chim. Phys.* **65** (1968), S. 44 – 45.
- LIKHTENSHTEIN, G. I.: *Spin Labeling Methods in Molecular Biology*. Wiley-VCH; New York, 1976. – URL [http://dx.doi.org/DOI:10.1016/0307-4412\(77\)90101-7](http://dx.doi.org/DOI:10.1016/0307-4412(77)90101-7)
- LILLY, A. A.; CRANE, J. M.; RANDALL, L. L.: Export chaperone SecB uses one surface of interaction for diverse unfolded polypeptide ligands. *Protein Sci.* **18** (2009), S. 1860 – 1868.
- LITTERER, L.; SCHAGAT, T.: Protein Expression in Less Time: A Short Induction Protocol for KRX. *Protein Expression (Promega Corporation)*. **96** (2007), S. 20 – 21.
- LUIRINK, J.; DOBBERSTEIN, B.: Mammalian and *Escherichia coli* signal recognition particles. *Mol. Microbiol.* **11** (1994), S. 9 – 13.
- LUIRINK, J.; SINNING, I.: SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim. Biophys. Acta.* **1694** (2004), S. 17 – 35.
- MAHDY, A. M.; WEBSTER, N. R.: Perioperative systemic haemostatic agents. *Br. J. Anaesth.* **93** (2004), S. 842 – 858.
- MANNUCCI, P. M.: Hemostatic drugs. *N. Engl. J. Med.* **339** (1998), S. 245 – 253.
- MATLACK, K.; MOTHES, W.; RAPOPORT, T.: Protein Translocation: Tunnel Vision. *Cell.* **92** (1998), S. 381 – 390.
- MCKINNEY, R. M.; SPILLANE, J. T.; PEARCE, G. W.: Factors Affecting the Rate of Reaction of Fluorescein Isothiocyanate with Serum Proteins. *J. Immunol.* **93** (1964), S. 232 – 242.
- MILOV, A. D.; SAMOILOVA, R. I.; TSVETKOV, Y. D.; FORMAGGIO, F.; TONIOLO, C.; RAAP, J.: Self-aggregation of spin-labeled alamethicin in ePC vesicles studied by pulsed electron-electron double resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007), S. 9260 – 9261.
- MÜLLER, J. P.: Influence of impaired chaperone or secretion function on SecB production in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178** (1996), S. 6097 – 6104.

- MOGK, A.; MAYER, M. P.; DEUERLING, E.: Mechanismen der Proteinfaltung: Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. *Biologie in unserer Zeit*. **3** (2001), S. 182 – 192.
- MURÉN, E. M.; SUCIU, D.; TOPPING, T. B.; KUMAMOTO, C. A.; RANDALL, L. L.: Mutational Alterations in the Homotetrameric Chaperone SecB That Implicate the Structure as Dimer of Dimers. *Journal of Biological Chemistry*. **274** (1999), S. 19397 – 19402.
- NELSON, D.; COX, M.: *Lehninger Biochemie*. 4. Auflage, vollst. überarb. u. erw. Aufl. Springer-Verlag, 2008. – URL <http://www.springer.com/978-3-540-68637-8>
- OHGI, K.; WATANABE, H.; EMMAN, K.; YOSHIDA, N.; IRIE, M.: Alkylation of a ribonuclease from *Streptomyces erythreus* with iodoacetate and iodoacetamide. *J. Biochem.* **90** (1981), S. 113 – 123.
- PANAHANDEH, S.; HOLZAPFEL, E.; MÜLLER, M.: *The twin arginin translocation pathway*. In: *Bacterial secreted proteins*. S. 23 – 43, Caister Academic Press; Norfolk, UK, 2009. – URL ISBN: 978-1-904455-42-4
- PANNIER, M.; VEIT, S.; GODT, A.; JESCHKE, G.; SPIESS, H. W.: Dead-Time Free Measurement of Dipole-Dipole Interactions between Electron Spins. *Journal of Magnetic Resonance*. **142** (2000), S. 331 – 340.
- PANSE, V. G.; BEENA, K.; PHILIPP, R.; TROMMER, W. E.; VOGEL, P. D.; VARADARAJAN, R.: Electron Spin Resonance and Fluorescence Studies of the Bound-state Conformation of a Model Protein Substrate to the Chaperone SecB. *Journal of Biological Chemistry*. **276** (2001), S. 33681 – 33688.
- PANSE, V. G.; UDGAONKAR, J. B.; VARADARAJAN, R.: SecB Binds Only to a Late Native-like Intermediate in the Folding Pathway of Barstar and Not to the Unfolded State. *Biochemistry*. **37** (1998), S. 14477 – 14483.
- PARKIN, S.; RUPP, B.; HOPE, H.: Structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor at 125 K definition of carboxyl-terminal residues Gly57 and Ala58. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **52** (1996), S. 18 – 29.
- QIAGEN: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. *The QIAexpressionist*. **6** (2003), S. 18 – 19.
- RANDALL, L. L.: Peptide Binding by Chaperone SecB: Implications for Recognition of Nonnative Structure. *Science*. **257** (1992), S. 241 – 245.

- RANDALL, L. L.; HARDY, S. J. S.: Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: a study *in vivo* of maltose-binding protein in *E. coli*. *Cell*. **46** (1986), S. 921 – 928.
- RANDALL, L. L.; HARDY, S. J. S.: SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **59** (2002), S. 1617 – 1623.
- RANDALL, L. L.; TOPPING, T. B.; HARDY, S. J. S.; PAVLOV, M. Y.; FREISTROFFER, D. V.; EHRENBERG, M.: Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94** (1997), S. 802 – 807.
- RANDALL, L. L.; TOPPING, T. B.; SUCIU, D.; HARDY, S. J. S.: Calorimetric analyses of the interaction between SecB and its ligands. *Protein Sci.* **7** (1998), S. 1195 – 1200.
- REICHENWALLNER, J.: *Strukturuntersuchungen am Maltose-Bindungsprotein mit Hilfe der gepulsten Elektron-Elektron-Doppelresonanz-Spektroskopie*, Technische Universität Kaiserslautern, Diplomarbeit, 2011.
- RICHTER, G.: *Praktische Biochemie, Grundlagen und Techniken*. Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York, 2003. – URL <http://webshop.thieme.de/webshop/product/thieme/9783131323811/detail.jsf>
- ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J.: Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass. Spectrom.* **11** (1984), S. 601.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – URL ISBN: 978-0879693091
- SCHAGAT, T.; FRIEDMAN, R.; OHANA; OTTO, P.; HARTNETT, J.; SLATER, M.: KRX Autoinduction Protocol: A Convenient Method for Protein Expression. *Protein Expression (Promega Corporation)*. **98** (2008), S. 16 – 18.
- SCHATZ, P. J.; RIGGS, P. D.; JACQ, A.; FATH, M. J.; BECKWITH, J.: The *secE* gene encodes an integral membrane protein required for protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **3** (1989), S. 1035 – 1044.
- SCHIEBEL, E.; DRIESSEN, A. J. M.; HARTL, F.-U.; WICKNER, W.: $\Delta\mu_{H^+}$ and ATP function at different steps in the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell*. **64** (1991), S. 927 – 939.
- SCHIAMANN, O.; PITON, N.; MU, Y.; STOCK, G.; ENGELS, J. W.; PRISNER, T. F.: A PELDOR Based Nanometer Distance Ruler for Oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004), S. 5722 – 5729.

- SCHWEIGER, A.: Elektronen Spin Resonanz. *Vorlesungsskript ETH Zürich*. (2003), S. 1 – 97.
- SCHWEIGER, A.; JESCHKE, G.: *Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance*. OUP; Oxford, 2001. – URL ISBN: 0-19-850634-1
- SIJBRANDI, R.; URBANUS, M. L.; TEN HAGEN-JONGMAN, C. M.; BERNSTEIN, H. D.; OUDEGA, B.; OTTO, B. R.; LUIRINK, J.: Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. *J. Biol. Chem.* **278** (2003), S. 4654 – 4659.
- SMIRNOVA, I.; KASHO, V.; CHOE, J.-Y.; ALTENBACH, C.; HUBBELL, W. L.; KABACK, H. R.: Sugar binding induces an outward facing conformation of LacY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104** (2007), S. 16504 – 16509.
- SMITH, B. J.: SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods in Molecular Biology.* **1** (1984), S. 41 – 56.
- SMITH, P.; KROHN, R.; HERMANSON, G.; MALLIA, A.; GARTNER, F.; PROVENZANO, M.; FUJIMOTO, E.; GOEKE, N.; OLSON, B.; KLENK, D.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry.* **150** (1985), S. 76 – 85.
- SMITH, V. F.; SCHWARTZ, B. L.; RANDALL, L. L.; SMITH, R. D.: Electrospray mass spectrometric investigation of the chaperone SecB. *Protein Sci.* **5** (1996), S. 488 – 494.
- STEINHOFF, H.-J.: Inter- and intra-molecular distances determined by EPR spectroscopy and site-directed spin labeling reveal protein-protein and protein-oligonucleotide interaction. *Biol. Chem.* **385** (2004), S. 913 – 920.
- STEINHOFF, H.-J.; DOMBROWSKY, O.; KARIM, C.; SCHNEIDERHAN, C.: Two dimensional diffusion of small molecules on protein surfaces: an EPR study of the restricted translational diffusion of protein-bound spin labels. *Eur. Biophys. J.* **20** (1991), S. 293 – 303.
- STEINHOFF, H.-J.; RADZWILL, N.; THEVIS, W.; LENZ, V.; BRANDENBURG, D.; ANTSON, A.; DODSON, G.; WOLLMER, A.: Determination of interspin distances between spin labels attached to insulin: comparison of electron paramagnetic resonance data with the X-ray structure. *Biophys. J.* **73** (1997), S. 3287 – 3298.
- STEINHOFF, H.-J.; SAVITSKY, A.; WEGENER, C.; PFEIFFER, M.; PLATO, M.; MÖBIUS, K.: High-field EPR studies of the structure and conformational changes of site directed spin labeled bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1457** (2000), S. 253 – 262.
- STRYER, L.: *Biochemie*. 1. korr. Nachdruck 1999 der 4. Auflage 1996. Spektrum Akad. Verl.; Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996. – URL <http://www.springer>.

com/spektrum+akademischer+verlag/biowissenschaften/biochemie/
book/978-3-8274-1800-5

SÜSSMUTH, R.; EBERSPÄCHER, J.; HAAG, R.; SPRINGER, W.: *Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum*. 1. Auflage. Georg Thieme Verlag; Stuttgart, 1997. – URL <http://dx.doi.org/doi:10.1002/star.19870391119>

TIMMEL, C.: *EPR Research Summary*. University of Oxford, 2011. – URL http://timmel.chem.ox.ac.uk/research/EPR_research_summary.pdf

TOPPING, T. B.; RANDALL, L. L.: Determination of the binding frame within a physiological ligand for the chaperone SecB. *Protein Science*. **3** (1994), S. 730 – 736.

TOPPING, T. B.; RANDALL, L. L.: Chaperone SecB from *Escherichia coli* Mediates Kinetic Partitioning via a Dynamic Equilibrium with Its Ligands. *J. Biol. Chem.* **272** (1997), S. 19314 – 19318.

TOPPING, T. B.; WOODBURY, R. L.; DIAMOND, D. L.; HARDY, S. J. S.; RANDALL, L. L.: Direct Demonstration That Homotetrameric Chaperone SecB Undergoes a Dynamic Dimer-Tetramer Equilibrium. *Journal of Biological Chemistry*. **276** (2001), S. 7437 – 7441.

TROMMER, W. E.: *Biochemisches Praktikum*. Technische Universität Kaiserslautern, 2007. – URL http://www.chemie.uni-kl.de/wcms/fileadmin/chemie/Dokumente/Dokumente_BC/fuer_stud/bc-skript200701.pdf

VAN DEN BERG, B.; CLEMONS, W. M.; COLLINSON, I.; MODIS, Y.; HARTMANN, E.; HARRISON, S. C.; RAPOPORT, T. A.: X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*. **427** (2004), S. 36 – 44.

VOET, D.; VOET, J. G.: *Biochemie*. 1. korr. Nachdruck der 1. Aufl. VCH Verlagsgesellschaft mbH; Weinheim, 1994. – URL ISBN:3-527-29249-7

VOLKERT, T. L.; BALEJA, J. D.; KUMAMOTO, C. A.: A highly mobile C-terminal tail of the *Escherichia coli* proteinexport chaperone SecB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264** (1999), S. 949 – 954.

WALDEN, M.: *Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung von zirkulierenden Proteinase-inhibitorischen Peptiden*, Universität Hannover, Dissertation, 2002.

WANG, Y.; BERG, E. A.; FENG, X.; SHEN, L.; SMITH, T.; COSTELLO, C. E.; ZHANG, Y.: Identification of surface-exposed components of MOMP of *Chlamydia trachomatis* serovar F. *Protein Science*. **15** (2006), S. 122 – 134.

- WEBER, R. T.: Elexsys E 580. *User's Manual Bruker Biospin Corporation*. Manual Version 2.0 (2005), S. 1 – 290.
- WEBER, R. T.: Pulsed ELDOR Option. *User's Manual Bruker Biospin Corporation*. Manual Version 1.0 (2006), S. 1 – 96.
- WEDLER, G.: *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. 4., völlig überarb. und erw. Aufl. Wiley-VCH; Weinheim, 1997. – URL ISBN: 3-527-29481-3
- WEISS, J. B.; BASSFORD, P. J.: The folding properties of the *Escherichia coli* maltose-binding protein influence its interaction with SecB *in vitro*. *J. Bacteriol.* **172** (1990), S. 3023 – 3029.
- WERTZ, J. E.; BOLTON, J. E.: *Electron Spin Resonance - Elementary Theory and Practical Applications*. Chapman and Hall; New York, 1972. – URL ISBN: 0-412-01181-6
- WICKNER, W.; LEONARD, M. R.: *Escherichia coli* Preprotein Translocase. *Journal of Biological Chemistry*. **271** (1996), S. 29514 – 29516.
- WICKNER, W.; SCHEKMAN, R.: Protein Translocation Across Biological Membranes. *Science*. **310** (2005), S. 1452 – 1456.
- XU, Z.; KNAFELS, J. D.; YOSHINO, K.: Crystal structure of the bacterial protein export chaperone SecB. *Nat. Struct. Biol.* **7** (2000), S. 1172 – 1177.
- ZHOU, J.; XU, Z.: Structural determinants of SecB recognition by SecA in bacterial proteintranslocation. *Nat. Struct. Biol.* **10** (2003), S. 942 – 947.
- ZHOU, J.; XU, Z.: The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: Implications for function. *Molecular Microbiology*. **58** (2005), S. 349 – 357.
- ZHOU, Y.; BOWLER, B. E.; LYNCH, K.; EATON, S. S.; EATON, G. R.: Interspin distances in spin-labeled metmyoglobin variants determined by saturation recovery EPR. *Biophys. J.* **79** (2000), S. 1039 – 1052.
- ZIMMER, J.; NAM, Y.; RAPOPORT, T. A.: Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature*. **455** (2008), S. 936 – 943.

A Anhang

A.1 Plasmidkarten

A.1.1 Vektor pET-20b(+)

pET-20b(+) sequence landmarks	
T7 promoter	353-369
T7 transcription start	352
<i>pelB</i> coding sequence	224-289
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-225
His* Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
pBR322 origin	1500
<i>bla</i> coding sequence	2261-3118
f1 origin	3250-3705

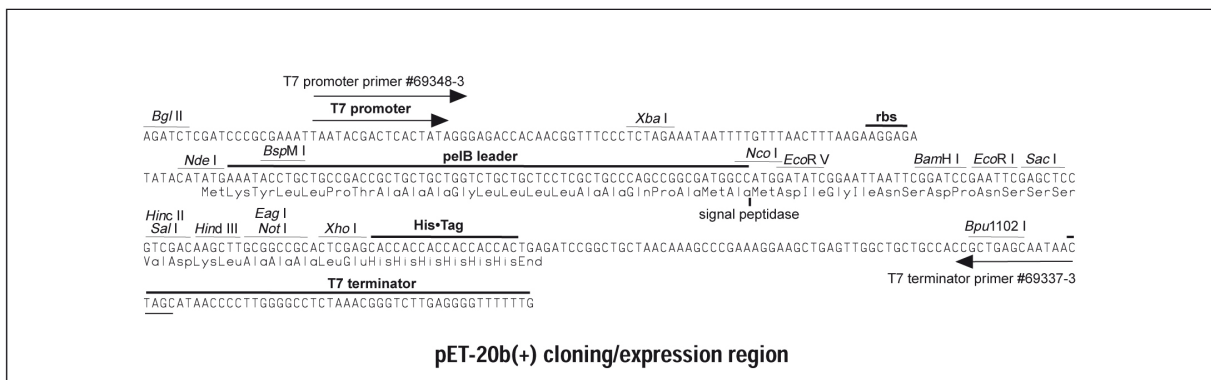
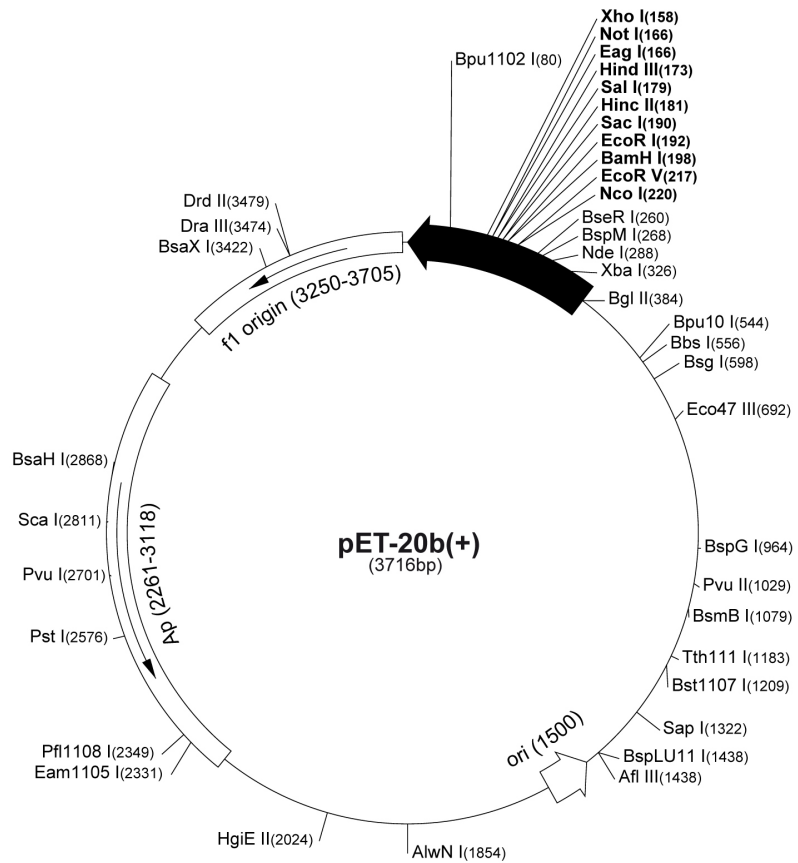


Abb. A.1.1: Plasmidkarte des Vektors pET-20b(+) (Quelle: Novagen).

A.1.2 Vektor pET-20b(+) SecB₁₋₁₅₅

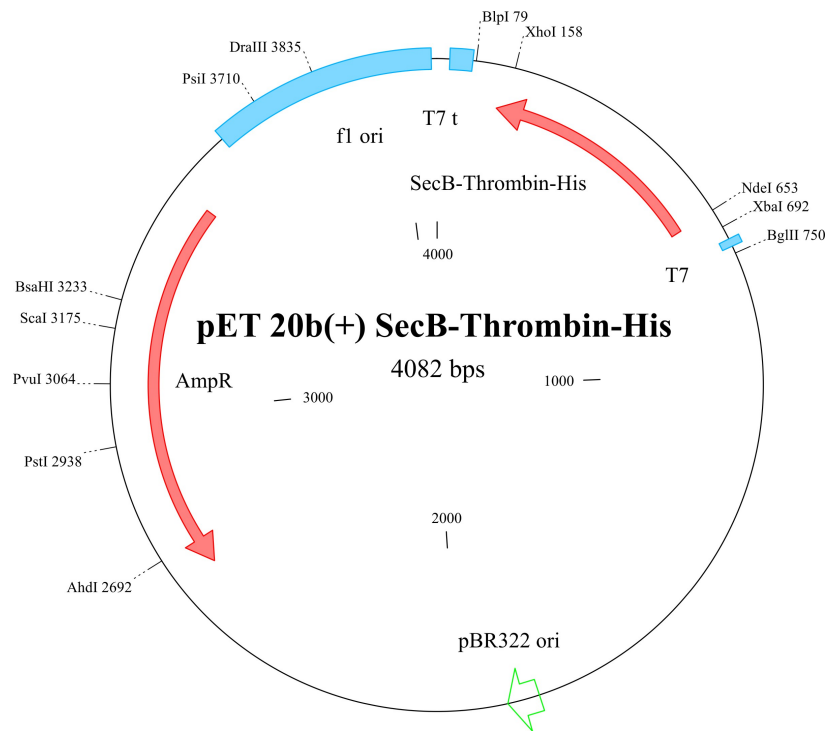


Abb. A.1.2: Plasmidkarte des Vektors pET-20b(+) mit dem inklonierten SecB₁₋₁₅₅-Gen sowie der Schnittstelle für Thrombin und dem 6x His-Tag.

A.1.3 Vektor pMA all-Ala-BPTI₁₋₅₈

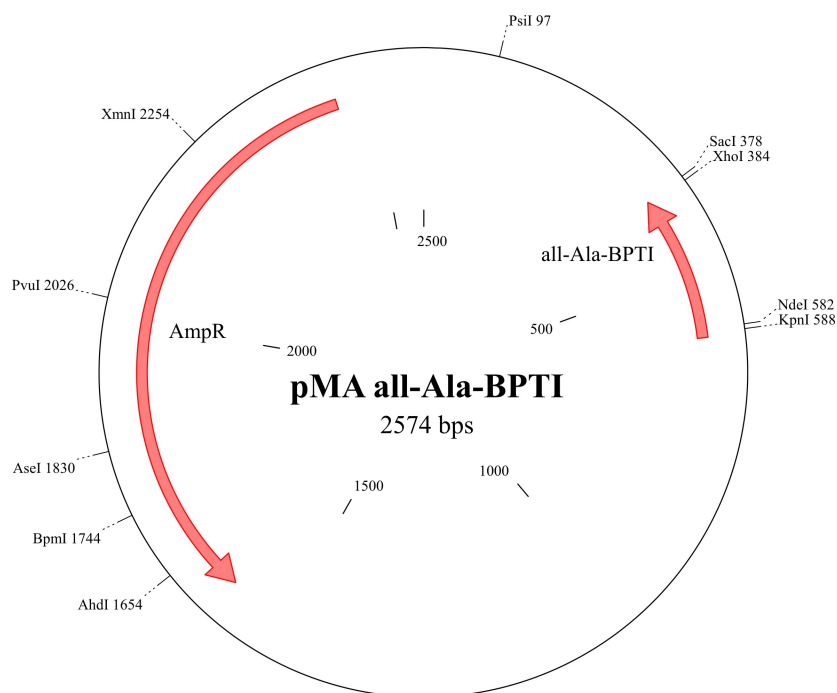


Abb. A.1.3: Plasmidkarte des Vektors pMA mit dem inklonierten all-Ala-BPTI₁₋₅₈-Gen.

A.1.4 Vektor pET-20b(+) EnGFP-His^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈

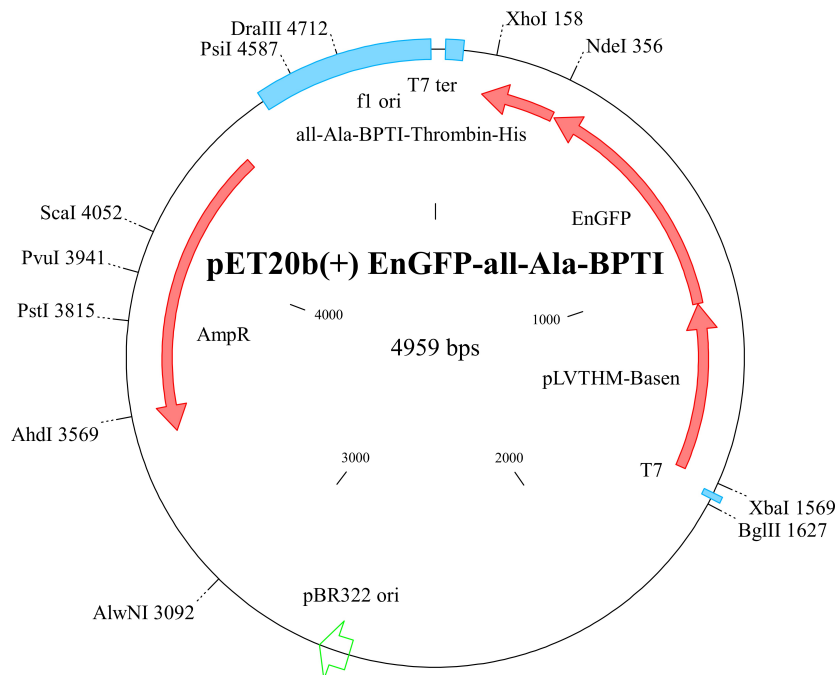


Abb. A.1.4: Plasmidkarte des Vektors pET-20b(+) mit den einklonierten EnGFP- und all-Ala-BPTI₁₋₅₈-Genen sowie der Schnittstelle für Thrombin und dem 6x His-Tag.

A.1.5 Vektor pET-20b(+) His^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ optimiert

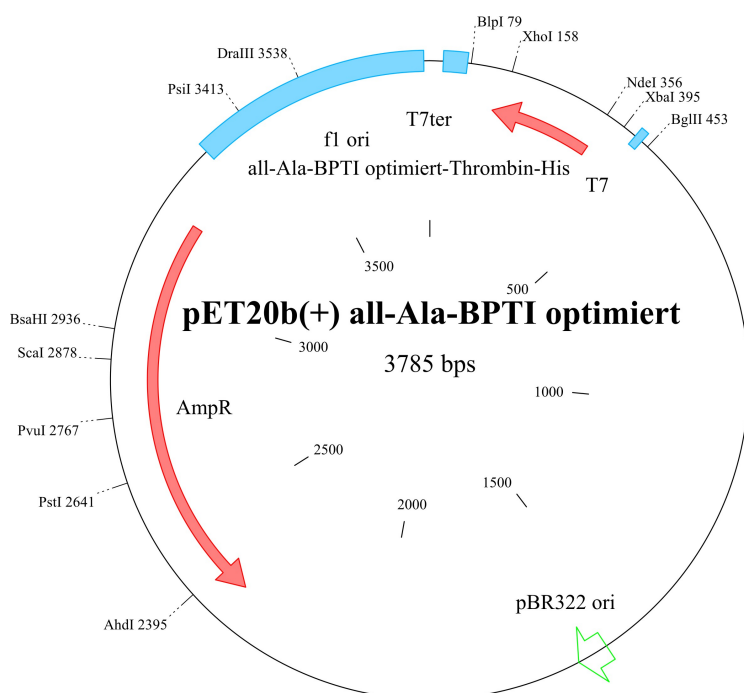


Abb. A.1.5: Plasmidkarte des Vektors pET-20b(+) mit dem optimierten all-Ala-BPTI₁₋₅₈-Gen sowie der Schnittstelle für Thrombin und dem 6x His-Tag.

A.2 Sequenzierergebnisse

A.2.1 Sequenzierung SecB WT

```

1      MneI      XhoII      MneI
acatatgca gaacaaaaca acactgaaat gactttccag atccaacgta
tftatcacgt ctgtttttgt tftgacttta ctgaaaggct tagtttgcat
>> h m s e q n n t e m t f q i q r
>> m s e q n n t e m t f q i q r
14

51      SfiI      BstBI      HaeIII
tttatccaa ggatatctct ttogaagcgc cgaacggcc gcaagttttc
aaatatggtt cctatagaga aagcttcgcg gttgocggy cftgcaaaag
i y t k d i s f e a p n a p h v f
>> .....SecB WT.....
i y t k d i s f e a p n a p h v f

101     EcoRV      SfiI      BstBI      HaeIII
cagaagatt ggcacaacaga agttaaactt gatctggata cggcatcttc
gtctttttaa cgtttggtct tcaattgaa ctagacctat cgcgtagaag
q k d w q p e v k l d l d t a s
>> .....SecB WT.....
q k d w q p e v k l d l d t a s

151     Bst1107I  AclI
ccaaactggca gatgacgtat acgaagtgggt actgctgttt accgtaacgg
ggttgaccgt ctactgcata tgettccaca tgacgcacaa tggcattgcc
s q l a d d v y e v v l r v t v t
>> .....SecB WT.....
s q l a d d v y e v v l r v t v t

201     cctctttggg cgaagaaacc cgttctctgt gtgaagtcca gcaagggggt
ggagaaacc cgttctttgg cgaagagaca cacttcaagt cgtcccgcga
a s l g e e t a f l c e v q q g g
>> .....SecB WT.....
a s l g e e t a f l c e v q q g g

251     atttttcca tcgctgggat cgaagcacc cagatggcg atgctctggg
taaaagggt agcggccata gcttccgtgg gctacccgg taacggacc
i f s i a g i e g t q m a h c l
>> .....SecB WT.....
i f s i a g i e g t q m a h c l
76

301     agcatactgc ccgaacattc tgttccogta tgetcgtgag tgcataccca
tcgtatgacg ggettgtaag acaaggcat acgagcactc acgtagtgg
g a y c p n l l f p y a r e c i t
>> .....SecB WT.....
g a y c p n l l f p y a r e c i t
90
102
113

```

Abb. A.2.1: Sequenzierergebnis für SecB WT. Alle für diese Arbeit relevanten Mutationsorte zur Generierung der jeweiligen SecB-Mutanten sind durch blaue Kästen hervorgehoben.

A.2.2 Sequenzierung SecB C97

```

113cII
HpaI
SecII
BglI
351 gcatgtatc ccgggttaca ttcccgcaac tgaacottgc gcocggttaac
cgtaccatag ggcgcactgt aaggcggttg acttggaaag cggccaattg
smvsvsrrgtfpqllnlapvn
>.....SecB C97.....>
smvsvsrrgtfpqllnlapvn

BspHI
401 ttgatgocg tgttcatgaa ctatttgcag cagcaggctg gcgaagttac
aagctaagc acaagtactt gataaacgtc gtcgtccgac cgtttccatg
fdalfmnyllqqqaqgeg
>.....SecB C97.....>
fdallfmnyllqqqaqgeg

XhoI
451 tgaagaacat cagatgcca gcagggcctt ggtgcccgcg ggcaagcctcg
actttctgta gtccatcaggt cgtccgccga ccacggcgcg ccgtccgagc
teehqda ss gllvprgsl
>.....SecB C97.....>
teehqda
Thrombinschnittstelle >>.....>>
lvprgs

501 agcaaccaca ccaccaccac tgagat
tcgtgtggtt ggtgtgtgtg actcta
>>...6x His-Tag...>
hhhhh
hhhhh
hhhhh

1 MeI
1 acatatgtca gaacaaaaca acactgaaat gactttccag atccaaacgta
tgtatacagt ctgttttgt tfgacttta ctgaaaggtc taggttgcac
hmsseqnntemtfqilqir
>>.....SecB C97.....>
msssqnnntemtfqilqir

EcoRV
BstBI
51 ttataccaa ggatatctct ttcgaagcgc cgaacgcgcc gcacgttttc
aaatatggtt cctatagaga aagcttcgag gcttgcgcgg cgtgcaaaaag
iytkdisfeapnaphvf
>.....SecB C97.....>
iytkdisfeapnaphvf

101 cagaagaatt ggcaaccaga agttaaacctt gatctggata cggcatcttc
gttttctaa ccgttgttct tcaatttgaa ctagacctat cgcgtagaag
qkdwqqpevkllldtas
>.....SecB C97.....>
qkdwqqpevkllldtas

Bst1107I
AclI
151 ccaactggca gatgacgtat acgaaagtgt actgcgtgtt accgtaaocgg
ggttgacogt ctactgcata tgcctcacca tgacgcacaa tggcattgoc
sqlladdvye vllrvttvt
>.....SecB C97.....>
sqlladdvye vllrvttvt

201 cctctttggg cgaagaaacc gcgttctcgg ctgaaagtca gcagggcgggt
ggagaaacc gctcttttgg cgaagagacc gacttcaagt cgtcccgcga
aslgheetafllae vqqgg
>.....SecB C97.....>
aslgheetafllae vqqgg
76

BsrDI
251 attttctcca tcgcgggtat cgaagccacc cagatggcgc attgccctggg
taaaagaggt agcggccata gcttccgtgg gtctaccocg taacggacc
ifsiagietqmahcl
>.....SecB C97.....>
ifsiagietqmahcl
97

BssSI
301 agcaatagcc ccgaacattc tgttccccta tgctcgtgag gccatcacca
tcgtatcggg ggctttagaag acaagggcat acgagcactc cggtagtgg
gayapnillfp yaeait
>.....SecB C97.....>
gayapnillfp yaeait
102
113

```

Abb. A.2.2: Sequenzierungsergebnis für SecB C97 (≅ SecB C76,102,113A). Die blau markierten Aminosäuren zeigen den erfolgreichen Austausch der in der WT-Sequenz auftretenden Cysteine an den Positionen 76, 102 und 113 gegen Alanin. Grün markiert ist das Cystein an Position 97, welches unverändert bleibt und somit das einzige Cystein in dieser Sequenz darstellt.

A.2.3 Sequenzierung SecB E90C,C97,102A

```

1 acatatgtca gaacaaaaca acactgaat gactttccag atccaacgta
  NdeI MneI XhoI Cfr10I
  tgataacagt cttgttttgt tgrgacttta ctgaaaaggtc tagtttgcgt
  h m s e q n n t e m t f q i q r
  >>.....SecB E90C.....>>
  m s e q n n t e m t f q i q r

51 tttataccaa ggatatctct ttcgaagcg cgaacgcgc gcaagtttct
  SviI HaeIII
  aaatatggtt cctatagaga aagtttcgcg gcttgcgcg cgtgcaaaaag
  i y t k d i s f e a p n a p h v f
  >.....SecB E90C.....>>
  i y t k d i s f e a p n a p h v f

101 cagaaaagatt ggcaaccaga agttaaacatt gatctggata cggcatcttc
  BstVI
  gtctttctaa ccgttggtct tcaatttgaa ctagacctat gcegtagaa
  q k d w q p e v k l d l d t a s
  >.....SecB E90C.....>>
  q k d w q p e v k l d l d t a s

151 ccaactggca gatgacgtat acgaagtgtt actgcgtgtt acegtaacgg
  ggttgaccgt ctactgcata tgcttcacca tgaccacaaa tggcatctgc
  s q l a d d v y e v v l r v t v t
  >.....SecB E90C.....>>
  s q l a d d v y e v v l r v t v t

201 cctctttggg cgaagaacc gcgttctctgt gtgaagtcca gcagggcgg
  ggagaacccc gcttctttgg cgaaggaca cacttcaagt cgtcccgcga
  a s l g e e t a f l c e v q q g g
  >.....SecB E90C.....>>
  a s l g e e t a f l c e v q q g g

251 attttttcca tcgcggttat ctgcggcacc cagatggcgc atgcccctggg
  BstI BstII BanI NspI SphI
  taaaaaaggt agcgcacata gacgcccgtgg gctaccgcg taocggaccc
  i f s i a g i c g t q m a h a l
  >.....SecB E90C.....>>
  i f s i a g i c g t q m a h a l 97

301 agcatacggc cogaacattc tgttcccgta tgctcgtgag tgcataccaa
  BssSI
  tcgtatgagg ggcttctaag acaagggat acgagcactc acgtatggtt
  g a y a p n i l f p y a r e c i t
  >.....SecB E90C.....>>
  g a y a p n i l f p y a r e c i t
  102

```

Abb. A.2.3: Sequenzierergebnis für SecB E90C,C97,102A. Die blau markierten Aminosäuren zeigen die für diese SecB-Mutante relevanten Mutationsorte. Abweichend zur Aminosäuresequenz des SecB WT wurde die Glutaminsäure an Position 90 gegen Cystein und die Cysteine an den Positionen 97 und 102 gegen Alanine ausgetauscht.

A.2.4 Sequenzierung SecB Q14C

```

101 acatatgtca gaacaaaca acactgaaat gactttccag atctgcgcga
    h m s e q n n t e m t f q i C r
    >>.....SecB Q14C.....>
1   m s e q n n t e m t f q i C r
    14

51 ttatatacaa ggatatctct ttcgaaagc cgaacgcgc gcacgttttc
aaatatggtt cciatagaga agcttcgcg gcttgcgcg cgtgcaaaa
i y t k d i s f e a p n a p h v f
>.....SecB Q14C.....>
1   i y t k d i s f e a p n a p h v f

101 cagaaagatt ggcaaccaga agttaaactt gatctggata cggcatcttc
gtctttcaa cggttggtct tcaattgaa ctagacctat gcgtagaag
q k d w q p e v k l d l d t a s
>.....SecB Q14C.....>
1   q k d w q p e v k l d l d t a s

151 ccaactggca gatgacgtat acgaagtgtt actcgcgttt accgtaacgg
ggttgacctt ctactgcata tgmtccaca tgaagcaca tggcattgcc
s q l a d d v y e v v l r v t v t
>.....SecB Q14C.....>
1   s q l a d d v y e v v l r v t v t

201 cctctttggg cgaagaaac cggttcctgt gtgaagtcca ggaaggcgg
ggagaacc cgtcttttgg cgaagagaca cacttcaagt cgtcccgcca
a s l g e e t a f l c e v q q g g
>.....SecB Q14C.....>
1   a s l g e e t a f l c e v q q g g

251 atttttcca tcgcggttat cgaaggcacc cagatggcgc attgcctggg
taaagaagt agcgcaccata gcttccgtgg gtcaccgcg taacggacc
i f s i a g i e q t q m a h c l
>.....SecB Q14C.....>
1   i f s i a g i e g t q m a h c l

301 agcatactgc cgaacattc tgttcccgta tgctogtgg tgcatcacca
tcgtatgacg ggcttgaag acaaggcat acgagcactc acgtatggtt
g a y c p n i l f p y a r e c i t
>.....SecB Q14C.....>
1   g a y c p n i l f p y a r e c i t

```

Abb. A.2.4: Sequenzierergebnis für SecB Q14C. Die blau markierte Aminosäure zeigt den für diese SecB-Mutante relevanten Mutationsort. Abweichend zur Aminosäuresequenz des SecB WT wurde das Glutamin an Position 14 gegen Cystein ausgetauscht.

A.2.5 Sequenzierung His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ optimiert

Startcodon
NdeI AS 5 Bst1107I AS 14
1 acatatgCGT cctgattttg cCctggaacc gccgtataca ggtccgGcta
tgtatagcga ggactaaaac gggaccttgg cggcatatgt ccaggcCgat
h m r p d f a l e p p y t g p a
>>.....all-Ala-BPTI optimiert.....>>
m r p d f a l e p p y t g p a

XcmI AS 30
51 aagcccgtat tatccgctat ttctataacg ccaaagctgg tctggcaca
ttcgggcata ataggcgata aagatattgc ggtttcgacc agaccgtggt
k a r i i r y f y n a k a g l a q
>.....all-Ala-BPTI optimiert.....>
k a r i i r y f y n a k a g l a q

AS 38
101 accttcgttt atggTggtGc tCgtgccaaa cgtaacaact tcaaagcgc
tggaagcaaa taccaccacg agcacggttt gcattgttga agttttcggc
t f v y g g a r a k r n n f k s
>.....all-Ala-BPTI optimiert.....>
t f v y g g a r a k r n n f k s

BsrDI AS 51 BspMI AS 55
151 cgaagatgca atgcgtacag caggtggagc cctggTccct cgtggtagtc
gcttctacgt tacgcatgtc gtccacctcg ggaccaggga gcaccatcag
a e d a m r t a g g a l v p r g s
>.....all-Ala-BPTI optimiert....>>
a e d a m r t a g g a
Thrombinschnittstelle >>.....>>
l v p r g s

XhoI Stopcodon
201 tcgagcacca ccaccaccac cactgagat
agctcgtggT ggtggTggTg gtgactcta
l e h h h h h h - d
>>...6x His-Tag...>>
h h h h h h

Abb. A.2.5: Sequenzierungsergebnis für His₆^T-all-Ala-BPTI₁₋₅₈ optimiert. Die blau markierten Aminosäuren zeigen die an diesen Positionen von der Originalsequenz (nicht dargestellt) abweichenden Änderungen. Die sechs im nativen BPTI vorkommenden Cysteine wurden durch Alanine ersetzt.

B Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei sämtlichen Personen bedanken, die mich während meiner Zeit als Diplomand und Doktorand des AK Trommer unterstützt haben. Ohne die folgenden Menschen wäre meine Dissertation vollkommen anders ausgefallen bzw. in dieser Art überhaupt nicht möglich gewesen. Mein ausdrücklicher Dank gilt...

- ... dem Chef, Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer, dem ich in erster Linie für die Überlassung des interessanten Themas und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie die Betreuung als solches danke. Hilfreiche Diskussionen, Ideen und Korrekturen sowie diverse Motivationsschübe haben mir meinen Weg in den letzten Jahren erleichtert. Eine ganz besondere Freude waren die gemeinsamen Geburtstags-/Weihnachtsfeiern und Grillfeste mit der AG, bei denen er stets aufs Vortrefflichste für unser leibliches Wohl gesorgt und unsere Mägen bis an die Belastungsgrenze gefordert hat.
- ... PD Dr. Gerd Klock für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation.
- ... Dr. Reinhard Philipp für die Unterstützung bei den MD Rechnungen und für die Hilfe, wenn der Computer mal ein Zipperlein hatte sowie für seine legendäre Feuerzangenbowle.
- ... Dr. Dariush Hinderberger und Dr. Yasar Akdogan (MPI für Polymerforschung, Mainz; Arbeitskreis Spiess) für ihre freundliche Unterstützung bei der Durchführung der EPR-Messungen sowie für die Daten-Analyse und die Bereitstellung von Messzeit und Geräten. Besonders möchte ich mich bei Dr. Dariush Hinderberger für seine stets schnelle und konstruktive Hilfe und Diskussionsbereitschaft in Sachen EPR bedanken.
- ... Prof. Dr. Raghavan Varadarajan vom Indian Institute of Science in Bangalore für die Bereitstellung der SecB-Gene, die als Ausgangspunkt für meine Arbeit dienten.
- ... Dr. Mirza Jakupovic dafür, dass er mir „als Chemikerin“ die Welt der gentechnischen Arbeiten eröffnet hat und das stets lustige Arbeitsklima.
- ... Frau Dipl.-Chem. Yvonne Schmitt (Fachrichtung Physikalische Chemie, TU Kaiserslautern) für ihre spontane und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Fluoreszenzmessungen.
- ... Dr. Thomas Schulenburg (Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern) für die Durchführung der ESI-MS/MS-Messungen sowie für seine geduldige Unterstützung bei der Datenbanksuche.

- ... Herrn Dipl.-Chem. Daniel Dehe für seine engagierte Hilfe im Umgang mit Pymol und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte.
- ... Bruker BioSpin, Karlsruhe für die schnelle Bereitstellung von EPR-Messzeit, als EPR-Messungen bei uns nicht möglich waren.
- ... Frau Dipl.-Biol. Anja Baron für die fröhliche Zusammenarbeit im Labor, die Betreuung meiner Diplomarbeit und ihre Freundschaft.
- ... meinen Diplomanden Ruth Amann, Christian Kopp und meinen Forschungspraktikanten Christian Nahstoll und Julian Zachmann für ihre engagierte und erfolgreiche Mitarbeit im Rahmen dieses Forschungsprojekts.
- ... unserer technischen Assistentin Elke Litmianski für ihr offenes Ohr bei allen Problemen.
- ... Carolin Fluck, die in ihrer Eigenschaft als stets hilfreiche und geduldige Frau für's Bürokratische das Leben sämtlicher AG-Mitglieder erleichterte.
- ... allen ehemaligen und aktuellen Arbeitskreismitgliedern für das sehr gute Arbeitsklima und die gemeinsame Zeit.
- ... Frau Dipl.-Chem. Anneken Grün und Frau Dipl.-Chem. Stefanie Schanz für die vielen lustigen Stunden, ihre hilfreichen Korrekturarbeiten und ihre Unterstützung.
- ... im Besonderen Dr. Felix Schmitt für seine Liebe, die Aufmunterung, das Verständnis und den Beistand auch in stressigen Phasen meiner Dissertation.
- ... vor allem meinen lieben Eltern, denen ich für die moralische und auch finanzielle Unterstützung während meines Studiums und der Promotion an dieser Stelle explizit danken möchte. Durch eine Vielzahl kleiner und großer Dinge haben sie mir das Leben in den letzten Jahren enorm erleichtert und standen mir stets bei, selbst wenn ich nur selten große Neuigkeiten zu erzählen hatte. Vielen Dank für Euren Rückhalt und dass Ihr immer an mich geglaubt habt!

C Publikationen

Veröffentlichungen

- **Conformational changes of the chaperone SecB upon binding to a model substrate - bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI)**

M. M. Haimann, Y. Akdogan, R. Philipp, R. Varadarajan, D. Hinderberger and W. E. Trommer

Biol. Chem. **392** (2011), 849 - 858.

Tagungsbeiträge

- **Conformational Changes and Bound State Conformation of Maltose Binding Protein (MBP) Upon Interaction with the Chaperone SecB: ESR and Fluorescence Studies**

A. Baron, K. Beena, G. Jescke, F. Leinisch, M. M. Haimann, M. N. Raju, A. Volkov, R. Varadarajan and W. E. Trommer

50th Annual Meeting Biophysical Society, Salt Lake City, Utah (USA) 18. - 22.02.2006.

- **Conformational Changes of SecB upon Interaction with Substrates as Studied by EPR Spectroscopy**

W. E. Trommer, A. Baron, M. M. Haimann, G. Jeschke, F. Leinisch, M. N. Raju, A. Volkov and R. Varadarajan

20th Symposium of The Protein Society, San Diego, California (USA) 05. - 09.08.2006.

- **Conformational Changes and Bound State Conformation of Maltose Binding Protein (MBP) Upon Interaction with the Chaperone SecB: ESR and Fluorescence Studies**

A. Baron, K. Beena, G. Jescke, F. Leinisch, M. M. Haimann, M. N. Raju, A. Volkov, R. Varadarajan and W. E. Trommer

58. Mosbacher Kolloquium, Protein and Lipid Sorting in Health and Disease, Mosbach (D) 29. - 31.03.2007.

- **Conformational Changes of SecB Upon Interaction with Maltose Binding Protein (MBP) As Well As the Precursor Form, preMBP: ESR and Fluorescence Studies**

A. Baron, M. M. Haimann, F. Leinisch, R. Varadarajan and W. E. Trommer

7th European Symposium of the Protein Society, Stockholm/Uppsala (S) 12. - 16.05.2007.

- **Conformational Changes of SecB Upon Binding to a Model Substrate - BPTI**
M. M. Haimann, Y. Akdogan, R. Philipp, D. Hinderberger and W. E. Trommer
14th In Vivo EPR Spectroscopy & Imaging and the 11th International EPR Spin trapping/Spin Labeling, San Juan (PRI) 02. - 06.05.2010.
- **Conformational Changes of SecB Upon Binding to a Model Substrate - BPTI**
M. M. Haimann, Y. Akdogan, R. Varadarajan, R. Philipp, D. Hinderberger and W. E. Trommer
52nd Rocky Mountain Conference on Analytical Chemistry, Snowmass, Colorado (USA) 01. - 05.08.2010.
- **Conformational Changes of SecB Upon Binding to a Model Substrate - BPTI**
M. M. Haimann, Y. Akdogan, R. Varadarajan, R. Philipp, D. Hinderberger and W. E. Trommer
SPIN 2011, Marseille (F) 26. - 29.09.2011.

D Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Michaela Maria Haimann

Promotion

11/2006 bis heute Promotionsstudium an der TU Kaiserslautern, FB Chemie
AG „Struktur-Funktions-Beziehungen in Proteinen“
Thema: *Proteintransport in E. coli: Untersuchung der Konformationsänderungen des Chaperons SecB durch Bindung an das Modellsubstrat Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (BPTI) mit Hilfe der EPR-Spektroskopie*

Hochschulstudium

10/2000 - 09/2006 Studium der Chemie an der TU Kaiserslautern
Abschluss des Studiums als Diplom-Chemikerin
12/2005 - 09/2006 Diplomarbeit in der Fachrichtung Biochemie, AG „Struktur-Funktions-Beziehungen in Proteinen“
Thema: *Proteinexport in Escherichia coli: Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen dem Export-Chaperon SecB und seinem Substrat preMBP mit Hilfe der ESR-Spektroskopie*

Schulbildung

Juni 2000 Abitur mit den Leistungskursen Chemie, Biologie und Englisch
1991 - 2000 Megina Gymnasium Mayen
1987 - 1991 Grundschule Hinter Burg in Mayen

Stipendium

11/2006 - 10/2010 Stipendiatin der TU Kaiserslautern

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Proteintransport in *E. coli*: Untersuchung der Konformationsänderungen des Chaperons SecB durch Bindung an das Modellsubstrat *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI) mit Hilfe der EPR-Spektroskopie“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Kaiserslautern, den 7. Dezember 2011

Michaela Haimann