

Strukturuntersuchungen am porenbildenden Translokationsprotein TatA_d aus *B. subtilis*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Chemiker
Torsten Hartwig Walther

aus

Bad Bergzabern

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Burkhard Luy

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2010

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Oktober 2006 bis August 2010 am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie, unter der Leitung von Prof. A. S. Ulrich angefertigt.

Außerdem wurden Teile der Arbeit in der Zeit von August 2008 bis November 2008 an der University of California, San Diego (USA) in der Gruppe von Prof. Dr. Stanley J. Opella angefertigt. Dieser Auslandsaufenthalt wurde durch ein Karlsruhe House of Young Scientists (KHYS) Auslandsstipendium gefördert.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich danke ich sehr für die Möglichkeit alle zur Verfügung stehenden Ressourcen nutzen zu können, die wertvollen Ratschläge sowie die freundliche Atmosphäre bei der Durchführung dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich für die offene Aufnahme in Ihren Arbeitskreis bedanken.

Herrn Dr. Stephan Grage möchte ich für seine exzellente Betreuung ganz herzlich danken. Er ist immer ein sehr kompetenter Ansprechpartner und überaus hilfsbereit. Vielen Dank einfach für Alles!

Frau Dr. Claudia Muhle-Goll danke ich für die große Unterstützung bei der Messung und Auswertung der Flüssigkeits-NMR Spektren.

Frau Dr. Olga Nolandt danke ich für die gute Zusammenarbeit beim TatA/TatC Projekt.

Herrn Dr. Jochen Bürck danke ich sehr für seine Hilfe bei der Durchführung der CD- und OCD-Messungen und für seine hilfreichen Tipps rund um die CD-Spektroskopie.

Herrn Marco Klein und Frau Nadine Roth danke ich für die sehr gute Arbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten.

Frau Dr. Sonja Müller danke ich für die gute Zusammenarbeit beim TatA-Projekt.

Herrn Dr. Christian Lange möchte ich für die sehr gute Betreuung während meiner Diplomarbeit danken.

Herrn Dr. Ulrich Sternberg und Herrn Igor Jakovkin danke ich für die Hilfe bei der Strukturberechnung mit COSMOS.

Herrn Dr. Sergii Afonin und Herrn Christian Weber danke ich für die Durchführung der MALDI-TOF-Messungen.

Herrn Prof. Dr. Stanley J. Opella möchte ich für die offene Aufnahme in seinen Arbeitskreis im Rahmen meines Auslandsaufenthaltes danken.

Frau Prof. Dr. Francesca M. Marassi danke ich für die Messzeit an ihrem Spektrometer am Burnham Institut, La Jolla (USA).

Herrn Dr. Fabian V. Filipp möchte ich für die sehr gute Betreuung während meines Auslandsaufenthaltes danken.

Allen weiteren Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die offene Aufnahme, eine ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre sowie die ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Hartwig und Ingrid, meinem Bruder Florian, meinen Großeltern Hanno, Erna, Helene, der Familie Birnbach und meiner Freundin Jessica Birnbach für ihre immerwährende Unterstützung.

Die vorliegende Arbeit ist ihnen gewidmet.

Auslandsaufenthalt wurde vom Karlsruhe House of Young Scientists (KHYS) gefördert.

Ich versichere hiermit wahrheitsgemäß die Arbeit, bis auf die dem Aufgabensteller bereits bekannte Hilfe, selbstständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben, sowie alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Änderungen übernommen wurde.

Karlsruhe, den 08. September 2010

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| 6-O-PC | 1,2-Di-O-hexyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine |
| Abb. | Abbildung |
| APH | Amphiphile Helix |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| a.u. | <i>Arbitrary units</i> |
| <i>B. subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| bidest. | Bidestilliert |
| bp | <i>Base pairs</i> (Basenpaare) |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin) |
| CD | <i>Circular dichroism</i> (Zirkulardichroismus) |
| Da | Dalton |
| dest. | Destilliert |
| DHPC | 1,2-Dihexanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine |
| DMPC | 1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine |
| DMPG | 1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)] (Natrium Salz) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| DNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DPC | Dodecylphosphocholine |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| FPLC | <i>Fast protein liquid chromatography</i> |
| g | Gramm |
| GC-Gehalt | Guanin-Cytosin Gehalt |
| GFP | <i>Green fluorescent protein</i> |
| h | Stunden |
| HisTag | Hexahistidin-Anhang |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| HSQC | <i>Heteronuclear single quantum correlation</i> |

| | |
|-------------------|---|
| INEPT | <i>Insensitive nuclei enhancement by polarization transfer</i> |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| kDa | Kilodalton |
| Kan | Kanamycin |
| Kan50 | Kanamycin in einer Konzentration von 50 μ g/ml |
| LB | Luria Bertani |
| M | Molar |
| mA | Milliamper |
| MALDI | <i>Matrix assisted laser desorption ionisation</i> |
| MD | Molekulardynamik |
| mg | Milligramm |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MRE | <i>Mean residue ellipticity</i> |
| MWCO | <i>Molecular weight cut off</i> |
| N | Nukleotid |
| NLS | Natriumlauroylsarcosin |
| nm | Nanometer |
| NMR | <i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz) |
| NOE | <i>Nuclear overhauser effect</i> |
| NOESY | <i>Nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i> |
| OCD | <i>Oriented circular dichroism</i> (Orientierter Zirkulardichroismus) |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei 600 nm |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion) |
| pH | <i>Pondus/potentia hydrogenii</i> (pH-Wert) |
| PhoD | Phosphodiesterase |
| P _i | Anorganischer Phosphor |
| PISEMA | <i>Polarization inversion spin exchange at magic angle</i> |

| | |
|----------------|--|
| PISA | <i>Polarity index slant angle</i> |
| P/L | Protein-Lipid-Verhältnis |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfourid |
| ppm | <i>Parts per million</i> (Teile von einer Million) |
| RDC | <i>Residual dipolar couplings</i> |
| rpm | <i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| rH | <i>Relative humidity</i> (relative Luftfeuchte) |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| Sec | Sekretorisch |
| SLF | <i>Separated-local-field</i> |
| SUV | <i>Small unilamellar vesicles</i> <i>Sonicated unilamellar vesicles</i> |
| Tat | <i>Twin arginine translocation</i> |
| TEMED | Tetramethyldiamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| T _m | Schmelzpunkt |
| TMS | Transmembransegment |
| TOF | <i>Time of flight</i> |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TSS | <i>Transformation storage solution</i> |
| U | <i>Unit</i> |
| UV | Ultraviolett |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikromolar |

Abbildungsverzeichnis

| | Seite |
|---------|--|
| Abb. 1 | Sec- und Tat-abhängige Signalpeptide..... 4 |
| Abb. 2 | Sequenz-Alignment der Signalpeptide von bestätigten und vorhergesagten Tat-Substraten aus <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i> 5 |
| Abb. 3 | Vorhergesagte Struktur der Komponenten des Tat-abhängigen Transports 7 |
| Abb. 4 | Elektronenmikroskopische Aufnahme eines TatA- und eines TatBC-Komplexes. 8 |
| Abb. 5 | Postulierter Mechanismus der Tat-abhängigen Translokation..... 10 |
| Abb. 6 | „Falltür-Mechanismus“ der Tat-abhängigen Translokation..... 11 |
| Abb. 7 | Definition der Elliptizität θ 18 |
| Abb. 8 | Elektronische Übergänge in der Peptidbindung im Fernen-UV-Bereich..... 19 |
| Abb. 9 | Berechnete CD-Basisspektren der reinen Sekundärstrukturelemente..... 20 |
| Abb. 10 | Aufbau einer OCD-Meßzelle 21 |
| Abb. 11 | Mögliche CD-Banden einer α -Helix in Abhängigkeit ihrer Orientierung 22 |
| Abb. 12 | OCD-Spektren eines α -helikalen Proteins mit transmembraner, schräger und parallel zur Membranoberfläche verlaufender Orientierung..... 22 |
| Abb. 13 | Kern-Zeeman-Aufspaltung eines Kerns mit dem Kernspin $I = \frac{1}{2}$ im Magnetfeld 25 |
| Abb. 14 | Das <i>rotating frame</i> und die Vektordarstellung der Gesamtmagnetisierung..... 26 |
| Abb. 15 | T_1 - und T_2 -Relaxation 27 |
| Abb. 16 | Die isotrope chemische Verschiebung 28 |
| Abb. 17 | Das Pulverspektrum 29 |
| Abb. 18 | Tensor-Ellipsoid im PAS-System 30 |
| Abb. 19 | Säkulare Näherung 31 |
| Abb. 20 | Polarkoordinatentransformation..... 32 |
| Abb. 21 | Der Dipoltensor 33 |
| Abb. 22 | Einfluss des Winkels θ auf die dipolare Kopplung 35 |
| Abb. 23 | Eigenschaften NMR-aktiver Kerne in biologischen Proben 36 |
| Abb. 24 | Kreuzpolarisation 37 |
| Abb. 25 | SAMPI4-Pulssequenz des SAMMY-Experiments..... 39 |
| Abb. 26 | Orientierungsabhängigkeit des PISA- <i>wheels</i> 40 |
| Abb. 27 | Schematische Darstellung der TatA _d -Fragmente und deren vorhergesagte Orientierung in der Membran [163] 42 |
| Abb. 28 | Aminosäuresequenz des TatA _d aus <i>B. subtilis</i> 42 |
| Abb. 29 | DNA-Sequenz des TatA _d aus <i>B. subtilis</i> 43 |

| | | |
|---------|--|----|
| Abb. 30 | pET-28-TatA ₁₋₄₅ Mutagenese Primer | 44 |
| Abb. 31 | Agarosegel der Mutagenese zu pET-28-TatA ₁₋₄₅ [165] | 44 |
| Abb. 32 | Aminosäuresequenz des TatA ₂₋₄₅ | 45 |
| Abb. 33 | pET-28-TatA ₁₋₄₅ F ₂₁ M Mutagenese Primer | 45 |
| Abb. 34 | Agarosegel der Mutagenese zu pET-28-TatA ₁₋₄₅ F ₂₁ M [165] | 46 |
| Abb. 35 | Aminosäuresequenz des TatA ₂₂₋₄₅ | 46 |
| Abb. 36 | pET-28-TatA ₁₋₂₇ Mutagenese Primer | 47 |
| Abb. 37 | Aminosäuresequenz des His-Tag im Expressionsvektor pET-28a(+) | 47 |
| Abb. 38 | pET-28-TatA ₁₋₂₇ Deletions-Mutagenese Primer | 47 |
| Abb. 39 | Aminosäuresequenz des TatA ₁₋₂₇ | 48 |
| Abb. 40 | pET-28-TatA ₂₂₋₇₀ Primer | 48 |
| Abb. 41 | Aminosäuresequenz des TatA ₂₂₋₇₀ | 48 |
| Abb. 42 | Wachstumskurve von <i>E. coli</i> bei der Expression von TatA ₂₋₄₅ in Voll- und Minimalmedium | 49 |
| Abb. 43 | SDS-PAGE einer Expression des TatA ₂₋₄₅ in Vollmedium [165] | 50 |
| Abb. 44 | Überblick Proteinaufreinigung | 51 |
| Abb. 45 | Lokalisation des TatA ₂₋₄₅ [165] | 52 |
| Abb. 46 | SDS-PAGE der Solubilisierung von TatA ₂₋₄₅ [165] | 52 |
| Abb. 47 | Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie [165] | 53 |
| Abb. 48 | SDS-PAGE einer subtraktiven Ni-NTA-Affinitätschromatographie [165] | 54 |
| Abb. 49 | Massen der TatA _d -Konstrukte | 56 |
| Abb. 50 | CD-Spektren der TatA-Fragmente mit Transmembranteil [163] | 58 |
| Abb. 51 | CD-Spektren der TatA _d -Fragmente TatA ₂₂₋₄₅ und TatA ₂₂₋₇₀ [163] | 59 |
| Abb. 52 | OCD-Spektren von TatA ₁₋₂₇ , TatA ₂₂₋₄₅ und TatA ₂₋₄₅ [163] | 61 |
| Abb. 53 | OCD-Spektrum von TatA ₂₋₇₀ | 62 |
| Abb. 54 | Mechanisch orientierte Lipiddoppelschicht auf Glasplättchen | 64 |
| Abb. 55 | Magentisch orientierbare Bizellen | 65 |
| Abb. 56 | ³¹ P-NMR-Spektren von DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen bei unterschiedlichen Temperaturen | 66 |
| Abb. 57 | Temperaturabhängigkeit der Orientierungsbildung von DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen beim Einbringen in das Magnetfeld | 67 |
| Abb. 58 | ³¹ P-NMR-Spektren von geflippten und ungeflippten DMPC/DMPG/6-O-PC- Bizellen | 68 |
| Abb. 59 | TatA ₂₋₄₅ in ungeflippten und geflippten DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen | 70 |

| | | |
|---------|--|-----|
| Abb. 60 | ^{15}N isotrope chemische Verschiebungen der Amin-Gruppen in den Seitenketten von Lys, Arg, Asn [189, 190]..... | 73 |
| Abb. 61 | TatA ₂₋₄₅ in ungeflippten und geflippten DMPC/6-O-PC-Bizellen..... | 74 |
| Abb. 62 | SAMMY-Spektrum von TatA ₂₋₄₅ in DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen..... | 76 |
| Abb. 63 | SAMMY-Spektrum von TatA ₂₋₄₅ in ungeflippten und geflippten DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen..... | 77 |
| Abb. 64 | Darstellung der Diederwinkel und ^{15}N -chemischen Verschiebungstensor Hauptachsenwerten in der Peptidebene..... | 79 |
| Abb. 65 | Bestimmung des Tiltwinkels τ der transmembranen und der amphiphilen α -Helix von TatA ₂₋₄₅ | 80 |
| Abb. 66 | Bewegungsausmittelung im Molekül..... | 81 |
| Abb. 67 | Bestimmung des Ordnungsparameters S der transmembranen und der amphiphilen α -Helix von TatA ₂₋₄₅ | 82 |
| Abb. 68 | Ordnungsparameters S und Tiltwinkel τ der transmembranen und der amphiphilen α -Helix von TatA ₂₋₄₅ | 83 |
| Abb. 69 | Definition des Rotationswinkels ρ | 84 |
| Abb. 70 | SAMMY-Spektrum von ^{15}N -Val-TatA ₂₋₄₅ | 85 |
| Abb. 71 | SAMMY-Spektrum von ^{15}N -Ile-TatA ₂₋₄₅ | 87 |
| Abb. 72 | SAMMY-Spektrum von ^{15}N -Phe-TatA ₂₋₄₅ | 89 |
| Abb. 73 | SAMMY-Spektrum von ^{15}N -Leu-TatA ₂₋₄₅ | 90 |
| Abb. 74 | SAMMY-Spektrum von ^{15}N -Ala-TatA ₂₋₄₅ | 91 |
| Abb. 75 | Darstellung der Orientierung der transmembranen und amphiphilen Helix anhand von <i>helical wheel plots</i> basierend auf dem aus SAMMY-Spektren bestimmten Rotationswinkel ρ | 92 |
| Abb. 76 | 3D-Computermodell der amphiphilen α -Helix..... | 94 |
| Abb. 77 | ^{15}N -TatA ₂₂₋₄₅ in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen..... | 96 |
| Abb. 78 | Einfluss des Detergenz NLS auf die Orientierung von TatA ₂₋₄₅ | 98 |
| Abb. 79 | Einfluss des pH-Wertes auf die Orientierung von TatA ₂₋₄₅ | 99 |
| Abb. 80 | Einfluss der Temperatur auf das SAMMY-Spektrum von ^{15}N -TatA ₂₋₄₅ | 100 |
| Abb. 81 | Einfluss unterschiedlicher Lipidsysteme auf das SAMMY-Spektrum von ^{15}N -TatA ₂₋₄₅ | 101 |
| Abb. 82 | ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{15}N -TatA ₂₋₄₅ in SDS-Mizellen..... | 104 |
| Abb. 83 | ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{15}N -TatA ₂₋₄₅ in isotropen Bizellen..... | 106 |

| | | |
|----------|---|-----|
| Abb. 84 | D ₂ O/H ₂ O-Austauschexperiment an TatA ₂₋₄₅ in SDS-Mizellen..... | 107 |
| Abb. 85 | ¹⁵ N-HSQC der selektiv ¹⁵ N-markierten Proben | 108 |
| Abb. 86 | <i>Long-range</i> NOEs von TatA ₂₋₄₅ zwischen Leu ₁₈ und Pro ₂₃ | 110 |
| Abb. 87 | Flüssigkeits-NMR Struktur von TatA ₂₋₄₅ | 111 |
| Abb. 88 | Mögliche Orientierungen von TatA ₂₋₄₅ aufgrund der Festkörper-NMR Daten... | 113 |
| Abb. 89 | <i>Long-range</i> NOEs der Loop-Region bei TatA _d nach Hu et al. | 115 |
| Abb. 90 | Dreidimensionales Strukturmodell von TatA ₂₋₄₅ in der Membran [206] | 116 |
| Abb. 91 | Der <i>Charge-Zipper</i> des TatA _d aus <i>B. subtilis</i> | 117 |
| Abb. 92 | Ladungsmuster von TatA aus verschiedenen Organismen | 118 |
| Abb. 93 | Funktionsweise des <i>Charge-Zippers</i> | 119 |
| Abb. 94 | Mechanismus der Porenbildung mittels <i>Charge-Zipper</i> | 121 |
| Abb. 95 | Strukturmodell der TatA-Pore basierend auf dem <i>Charge-Zipper</i> Mechanismus | 122 |
| Abb. 96 | Größenvergleich des vorgeschlagenen TatA-Dodecamers mit einem von Gohlke et al. [74] charakterisierten TatA-Komplex (Klasse 1) | 123 |
| Abb. 97 | peqGOLD DNA-Sizer III..... | 134 |
| Abb. 98 | PageRuler Protein Ladder | 134 |
| Abb. 99 | PageRuler Prestained Protein Ladder Plus | 135 |
| Abb. 100 | Expressionsvektor pET-28a(+)...... | 136 |
| Abb. 101 | Temperaturprogramm für die Durchführung einer PCR..... | 148 |
| Abb. 102 | Minimalmedium für die Expression Isotopen-markierter Proteine..... | 152 |
| Abb. 103 | Aminosäuremix für selektive ¹⁵ N-Markierung von Proteinen..... | 153 |
| Abb. 104 | Zusammensetzung des Polyacrylamidgels | 158 |

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Stofftransport in der Zelle | 1 |
| 1.2 Proteintranslokation | 2 |
| 1.3 Tat-abhängiger Transport | 2 |
| 1.3.1 Das Tat-abhängige Signalpeptid | 3 |
| 1.3.2 Komponenten des Tat-abhängigen Transports | 6 |
| 1.3.3 Mechanismus der Tat-abhängigen Translokation | 9 |
| 1.3.4 Tat-abhängiger Transport in <i>Bacillus subtilis</i> | 12 |
| 1.3.5 Bedeutung des Tat-abhängigen Transports | 14 |
| 2 Theoretische Grundlagen | 16 |
| 2.1 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie | 16 |
| 2.2 Orientierte CD-Spektroskopie | 20 |
| 2.3 NMR-Spektroskopie | 24 |
| 2.3.1 Chemische Verschiebung | 27 |
| 2.3.2 Skalare Kopplungen | 32 |
| 2.3.3 Die dipolare Kopplung | 33 |
| 2.3.4 Quadrupolaufspaltung | 35 |
| 2.4 Festkörper-NMR Experimente zur Proteinstrukturanalyse | 36 |
| 3 Aufgabenstellung | 41 |
| 4 Ergebnisse | 42 |
| 4.1 Darstellung der TatA _d -Fragmente | 42 |
| 4.1.1 Darstellung der Expressionsvektoren für die TatA _d -Fragmente | 43 |
| 4.1.2 Biosynthese der TatA _d -Fragmente | 49 |
| 4.1.3 Aufreinigung der TatA _d -Fragmente | 51 |
| 4.1.4 Charakterisierung der TatA _d -Fragmente | 56 |
| 4.2 Zirkulardichroismus (CD) Messungen an den TatA _d -Fragmenten | 57 |
| 4.2.1 CD-Spektroskopie an TatA _d -Fragmenten in Lipid-Vesikeln | 57 |
| 4.2.2 OCD-Spektroskopie von TatA _d -Fragmenten in orientierten Lipiddoppelschichten | 60 |
| 4.3 Festkörper-NMR Messungen an TatA _d -Fragmenten | 63 |
| 4.3.1 Rekonstitution des Proteins in Modellmembransystemen | 63 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.3.2 | 1D- ¹⁵ N-NMR Messungen an TatA ₂₋₄₅ in Bizellen..... | 70 |
| 4.3.3 | 2D-NMR Messungen an TatA ₂₋₄₅ in Bizellen..... | 75 |
| 4.3.4 | 2D-NMR Messung an TatA ₂₂₋₄₅ in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen..... | 96 |
| 4.3.5 | Untersuchung des Einflusses verschiedener Umgebungsfaktoren auf die Orientierung von TatA ₂₋₄₅ | 98 |
| 4.4 | Flüssigkeits-NMR Messungen..... | 103 |
| 4.4.1 | ¹ H/ ¹⁵ N-HSQC Spektroskopie..... | 103 |
| 4.4.2 | NOESY-Spektren..... | 109 |
| 5 | Diskussion..... | 113 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 125 |
| 7 | Material..... | 127 |
| 7.1 | Geräte..... | 127 |
| 7.2 | Verbrauchsmaterialien..... | 130 |
| 7.3 | Chemikalien..... | 131 |
| 7.4 | Marker..... | 134 |
| 7.4.1 | DNA Marker..... | 134 |
| 7.4.2 | Protein Marker..... | 134 |
| 7.4.3 | Western-Blot Marker..... | 135 |
| 7.5 | Kits für die Molekularbiologie..... | 135 |
| 7.6 | Chromatographiesäulen..... | 135 |
| 7.7 | Enzyme..... | 135 |
| 7.8 | Vektoren..... | 136 |
| 7.9 | Bakterienstämme..... | 136 |
| 7.10 | Expressionsstämme..... | 136 |
| 7.11 | Antikörper..... | 136 |
| 7.12 | Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen..... | 137 |
| 7.12.1 | Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie..... | 137 |
| 7.12.2 | Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese..... | 140 |
| 7.12.3 | Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE..... | 140 |
| 7.12.4 | Puffer und Lösungen für den Western-Blot..... | 141 |
| 7.12.5 | Puffer und Lösungen für die Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie.... | 142 |
| 7.12.6 | Puffer für Gelfiltration..... | 143 |
| 7.13 | Software..... | 143 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 8 | Methoden..... | 145 |
| 8.1 | Mikrobiologische Arbeitsmethoden..... | 145 |
| 8.1.1 | Steriltechnik..... | 145 |
| 8.1.2 | Ansetzen einer Übernachtskultur..... | 145 |
| 8.1.3 | Ansetzen einer Glycerinkultur..... | 145 |
| 8.1.4 | Herstellung von Agar-Platten..... | 145 |
| 8.1.5 | Ausstrich aus einer Glycerinkultur..... | 145 |
| 8.2 | Genetische Arbeitsmethoden..... | 146 |
| 8.2.1 | Plasmid-DNA Isolierung..... | 146 |
| 8.2.2 | Ethanol-fällung der Plasmid-DNA..... | 146 |
| 8.2.3 | DNA-Sequenzierung..... | 147 |
| 8.2.4 | Primer Design..... | 147 |
| 8.2.5 | Mutagenese..... | 147 |
| 8.2.6 | Durchführung einer PCR..... | 148 |
| 8.2.7 | Reinigung des PCR-Produktes..... | 148 |
| 8.2.8 | Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen..... | 149 |
| 8.2.9 | Agarose-Gelelektrophorese..... | 149 |
| 8.2.10 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel..... | 149 |
| 8.2.11 | Ligation..... | 150 |
| 8.2.12 | Darstellung hitzekompetenter Zellen..... | 150 |
| 8.2.13 | Hitzetransformation..... | 150 |
| 8.2.14 | Darstellung elektrokompeter Zellen..... | 151 |
| 8.2.15 | Elektrotransformation..... | 151 |
| 8.3 | Proteinchemische Methoden..... | 151 |
| 8.3.1 | Testexpression..... | 151 |
| 8.3.2 | Expression..... | 152 |
| 8.3.3 | Zellaufschluss mit der French-Press..... | 153 |
| 8.3.4 | Zellaufschluss mittels Ultraschall..... | 154 |
| 8.3.5 | Lokalisation des Proteins..... | 154 |
| 8.3.6 | Aufkonzentration von Proteinlösungen..... | 154 |
| 8.3.7 | Dialyse..... | 155 |
| 8.3.8 | Bromcyanspaltung..... | 155 |
| 8.4 | Chromatographische Methoden..... | 155 |
| 8.4.1 | Nickel-Affinitätschromatographie..... | 155 |

| | |
|--|------------|
| 8.4.2 Gelfiltrationschromatographie | 157 |
| 8.5 Analytik | 157 |
| 8.5.1 UV-Quantifizierung | 157 |
| 8.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 158 |
| 8.5.3 Western-Blot | 159 |
| 8.5.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie | 160 |
| 8.5.5 CD-Spektroskopie | 160 |
| 8.5.6 Orientierte CD-Spektroskopie | 162 |
| 8.5.7 Festkörper-NMR Spektroskopie | 162 |
| 8.5.8 Flüssigkeits-NMR Spektroskopie | 165 |
| 9 Literaturverzeichnis | 167 |
| 10 Publikationsliste | 184 |
| 10.1 Beiträge in referenzierten Zeitschriften | 184 |
| 10.2 Tagungsbeiträge | 185 |
| 11 Lebenslauf | 187 |

1 Einleitung

In nahezu allen biologischen Prozessen spielen Proteine eine wichtige Rolle. Selbst die von Berzelius geprägte Bezeichnung dieser Stoffgruppe leitet sich von dem griechischen Wort *proteios* („erstrangig“) ab und wurde bereits im Jahr 1839 in einer Veröffentlichung von Mulder zur Betonung der Wichtigkeit dieser Stoffgruppe erwähnt [1]. In einer Zelle sind Proteine unverzichtbare Bestandteile, die viele Aufgaben, wie zum Beispiel Katalyse, Immunabwehr, Signaltransduktion, Speicherung und natürlich auch den Transport von Molekülen übernehmen.

1.1 Stofftransport in der Zelle

In einer Zelle müssen ununterbrochen verschiedenste Stoffe transportiert werden. So müssen beispielsweise Nährstoffe in die Zelle aufgenommen, Abfallprodukte entsorgt, Ionengradienten aufgebaut und Enzyme an ihren Bestimmungsort gebracht werden, um dort ihre vorherbestimmte Aufgabe erfüllen zu können. Auf diesem Weg müssen oftmals eine oder mehrere hydrophobe Barrieren in Form von Biomembranen überwunden werden. Während kleine, lipophile Stoffe diese Hindernisse oftmals ohne spezielle Transportmechanismen durch freie Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten überwinden können, benötigen größere oder hydrophile Substanzen Hilfe in Form von membrandurchspannenden Proteinen. Diese Poren- oder Transporterproteine nehmen somit eine bedeutende Rolle in einer Zelle ein, weshalb es wichtig ist, deren Aufbau und Funktionsweise genauestens zu untersuchen. So gibt es beispielsweise recht einfach aufgebaute Ionenporen, welche Ionen und kleine organische Moleküle nur entlang eines Konzentrationsgradienten hindurchfließen lassen. Eine weitere Form dieser „erleichterten Diffusion“ stellen Transporter dar, welche ein Substrat binden und auf der anderen Seite der Biomembran wieder freisetzen. Die etwas komplexeren Translokasen, welche ein spezifisches Substrat gegen einen Konzentrationsgradienten transportieren, benötigen eine Energiequelle. So nutzen beispielsweise die Na^+/K^+ -Antiporter in den Nervenzellen oder auch die Protonenpumpen in der Magenschleimhaut die chemische Bindungsenergie durch ATP-Hydrolyse als Energiequelle. Eine weitere Energiequelle kann die Ausnutzung eines bereits aufgebauten Konzentrationsgradienten darstellen, wie es bei den sekundär aktiven Translokasen beobachtet werden kann. So wird beispielsweise Glucose durch einen Symport mit Natriumionen, unter Ausnutzung des durch die Na^+/K^+ -Ionenpumpe aufgebauten Konzentrationsgradienten, in die Darmzellen aufgenommen.

1.2 Proteintranslokation

Für den Transport großer Substrate wie Proteine sind noch sehr viel komplexere Transportmechanismen notwendig. Proteine werden im Cytoplasma der Bakterien synthetisiert und müssen auf dem Weg zu ihrem Bestimmungsort oftmals Membranen passieren. Hierfür werden sie als Präkursorproteine mit einem Signalpeptid synthetisiert, welches die Transportroute, die Transporteffizienz und das Transportziel festlegt [2, 3]. Die eigentliche Transportpore, welche das Passieren der Membranbarriere ermöglicht, ist oftmals ein Multiproteinkomplex, der je nach Transportroute unterschiedlich zusammengesetzt ist. Den bisher am Besten charakterisierten Proteintransportpfad stellt der Sec-abhängige Transport dar. Hierbei bindet kurz nach der Translation der Targetingfaktor SecB an das zu transportierende Protein, wobei es dessen Faltung verhindert und es zum membranassoziierten SecA führt. Dieser Komplex lagert sich mit der SecYEG-Pore zusammen, und SecA fädelt das Protein unter ATP-Hydrolyse durch die Membran. In diesem Fall verläuft der Transport posttranslational, aber es existiert auch eine cotranslationale Variante des Sec-abhängigen Transports [3, 4].

In Gram-negativen Bakterien müssen die sezernierten Proteine neben der Cytoplasmamembran auch noch die Außenmembran überwinden. Deshalb stehen hier verschiedene Transportsysteme zur Verfügung, welche diese Aufgabe übernehmen [5].

Bei den deutlich komplexer aufgebauten Eukaryonten müssen Proteine nicht nur über oder in die Zellmembran, sondern auch in die unterschiedlichsten Zellkompartimente transportiert werden. Der Transport von Proteinen in den Organellen ist ähnlich zu dem extrazellulären Transport in Prokaryonten aufgebaut. Im endoplasmatischen Retikulum ist dieser beispielsweise Sec-ähnlich geprägt. In den Mitochondrien und Chloroplasten existieren sowohl Sec- als auch Tat-ähnliche Transportsysteme [6].

1.3 Tat-abhängiger Transport

Im Jahr 1991 entdeckten Mould und Robinson einen Proteintransport über die Thylakoidmembran der Chloroplasten, der im Gegensatz zum ATP-getriebenen Sec-abhängigen Transport nur einen Protonengradient als Energiequelle benötigt [7]. Der sogenannte Tat-abhängige Transport existiert jedoch nicht nur in Pflanzen, sondern auch in Bakterien und Archaea [8, 9]. Die Bezeichnung „*T*win *a*rginine *t*ranslocation“ (Tat) leitet sich von dem charakteristischen Doppel-Arginin Sequenzmotiv des zugehörigen Signalpeptids ab, welches alle für diesen Transport bestimmten Proteine tragen [10, 11].

Aufgrund seiner einzigartigen Fähigkeit gefaltete Proteine zu transportieren wurde zu Beginn angenommen, dass dieser Transportapparat hauptsächlich für Protein-Cofaktor Komplexe Anwendung findet [8, 12]. Für die Bindung eines Cofaktors muss das Protein gefaltet sein und somit wird es transportinkompetent für den Sec-abhängigen Transport. In diesem Fall müsste der Cofaktor also getrennt vom Protein transportiert werden, wobei die Faltung und Cofaktor-Insertion erst nach dem Transport außerhalb der Zelle erfolgen könnte. Der Tat-abhängige Transport hingegen kann gefaltete Protein-Cofaktor Komplexe, wie beispielsweise Redox-Proteine, in einem Schritt über die Membran transportieren [13]. Dieser Proteintransportweg ist auch noch an vielen weiteren zellulären Prozessen beteiligt [14], wie beispielsweise der Zellwandsynthese [15-17], Beweglichkeit [18, 19], Zellatmung [20, 21] und Biofilm-Ausbildung [18, 22]. In manchen Archaea wird sogar ein Großteil der sezernierten Proteine Tat-abhängig transportiert [23, 24]. Im halophilen Archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1 tragen beispielsweise 60% der sekretierten Proteine ein Tat-abhängiges Signalpeptid [25]. Dieser hohe Anteil ist wahrscheinlich den extremen Umweltbedingungen in deren Lebensraum geschuldet, da die Proteine noch in der Zelle gefaltet werden müssen um eine Aggregation zu verhindern und somit inkompatibel für den Sec-abhängigen Transport werden [25, 26]. Nicht nur der Transport durch die Membran, sondern auch die Insertion von Membranproteinen konnte Tat-vermittelt festgestellt werden [21, 27]. Dies zeigt, dass der Tat-abhängige Transport eine bedeutende Rolle in der Zelle einnimmt.

1.3.1 Das Tat-abhängige Signalpeptid

Alle Proteine, deren Bestimmungsort nicht im Cytosol liegt, benötigen ein Exportsignal [28]. Diese sogenannten Signalpeptide sind eine meistens N-terminale Verlängerung des eigentlichen Proteins, welche den Transportweg, die Transporteffizienz und das Transportziel festlegen [2, 3]. Das für den Transport bestimmte Protein wird dabei als Präkursorprotein zusammen mit der Signalsequenz translatiert. Nach dem Transportvorgang wird das Signalpeptid meistens von einer Signalpeptidase abgespalten und das Protein freigesetzt [4]. Das Tat-abhängige Signalpeptid ist ein N-terminales Signalpeptid und kann ähnlich zu dem Sec-abhängigen in drei Bereiche aufgeteilt werden [2, 29]. Signalpeptide sind im Allgemeinen, mit Ausnahme des charakteristischen Doppel-Arginin Sequenzmotivs im Fall des Tat-abhängigen Signalpeptids, in ihrer Sequenz nur wenig konserviert und somit sind die markanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der drei Bereiche für die Funktion verantwortlich [3, 30-32]. Basierend auf der Tat-Erkennungssequenz und unter Zuhilfenahme

transportierenden Proteins, wobei die Schnittstellensequenz der Signalpeptidase I oftmals Ala-x-Ala ist [37, 38]. Außerdem findet man im C-Bereich im Falle des Tat-abhängigen Signalpeptides teilweise ein Lysin, welches einen Sec-abhängigen Transport verhindern soll und somit als „Sec-Avoidance“-Signal charakterisiert wurde [39].

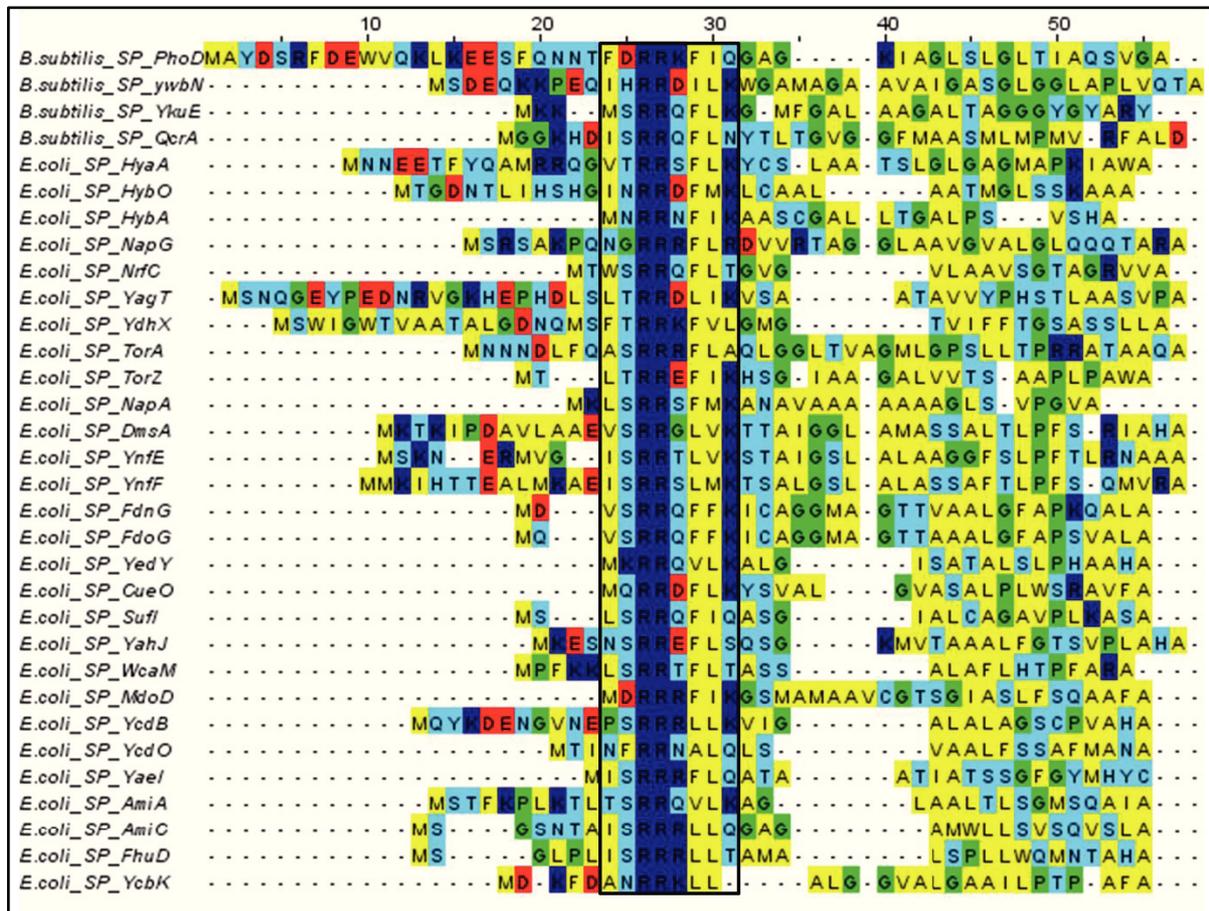


Abb. 2 Sequenz-Alignment der Signalpeptide von bestätigten und vorhergesagten Tat-Substraten aus *B. subtilis* und *E. coli*

Das Sequenzalignment wurde mit den Programmen ClustalW [40] und Jalview [41] erstellt. Die

Konsensussequenz wurde mit einer schwarzen Box und die Aminosäuren farblich markiert:

gelb - hydrophob (Leu, Ile, Val, Phe, Ala, Met, Trp); rot - anionisch (Asp, Glu); blau - kationisch (Lys, Arg);

cyan - polar (Ser, Thr, Gln, Asn, His, Tyr, Cys); grün - Helixbrecher (Pro, Gly).

Die Signalsequenzen von *E. coli* wurden aus [42] und die Signalsequenzen von *B. subtilis* wurden aus [43, 44] übernommen.

Mit einer Länge von etwa 26 - 58 Aminosäuren sind Tat-abhängige Signalpeptide im Vergleich zu Sec-abhängigen, die nur aus 18 - 26 Aminosäuren bestehen, deutlich länger [2]. In Abb. 2 ist ein Sequenz-Alignment der Tat-abhängigen Signalpeptide aus *E. coli* und *B. subtilis* gezeigt. Wie bereits zuvor erwähnt, sind die Signalpeptide mit Ausnahme des Doppel-Arginin Sequenzmotivs kaum konserviert. Es ist jedoch deutlich der geladene N-Bereich des Signalpeptids von dem darauffolgenden hydrophoben H-Bereich unterscheidbar. Wie man an dem Sequenz-Alignment sehen kann, besteht die

Erkennungssequenz jedoch nicht nur aus dem reinen Doppel-Arginin, sondern es folgen nach einer variablen Aminosäure (bevorzugt polar oder geladen) zwei hydrophobe Aminosäuren (bevorzugt Phenylalanin und Leucin) und oftmals endet die konservierte Sequenz mit einem Lysin (oder einer polaren Aminosäure). Auch die beiden Aminosäuren vor dem Doppel-Arginin Sequenzmotiv zeigen eine gewisse Konserviertheit, und so beginnt die Sequenz meistens mit einer hydrophoben gefolgt von einer polaren Aminosäure (bevorzugt Serin und Threonin). Die Erkennungssequenz der Tat-abhängigen Signalpeptide wird demnach oftmals als SRRxFLK angegeben (wobei x eine variable Aminosäure darstellt) [12, 45, 46]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das Doppel-Arginin alleine keine unabdingbare Prämisse für den Tat-abhängigen Transport darstellt, da zumindest ein Arginin auch durch Lysin ersetzt werden kann [45, 47, 48]. Bei einigen der gezeigten Signalpeptide ist auch das, als „*Sec-Avoidance*“ Signal charakterisierte, isolierte Lysin im C-Bereich erkennbar [39], wobei jedoch bei den hier ausgewählten Signalsequenzen häufiger ein isoliertes Arginin in diesem Bereich auftritt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch dieses einen Sec-abhängigen Transport verhindern kann [36, 48]. Für die Festlegung der Tat-abhängigen Transportroute ist also demnach nicht nur das Doppel-Arginin Sequenzmotiv verantwortlich, sondern vielmehr determiniert ein ausgeklügeltes Zusammenspiel vieler subtiler Faktoren ein Substrat zur Tat-Translokase.

1.3.2 Komponenten des Tat-abhängigen Transports

Nach der Entdeckung des Tat-abhängigen Transports in den Chloroplasten der Pflanzenzellen wurden die Proteine Tha4 (*thylakoid assembly 4*) [49, 50], Hcf106 (*high-chlorophyll fluorescent 106*) [50, 51] und cpTatC (*chloroplast TatC*) [52, 53] als die Komponenten des Tat-abhängigen Transports charakterisiert. Auch in Prokaryonten hat man Gene gefunden, welche ebenfalls für entsprechende, homologe Komponenten der Tat-abhängigen Proteintranslokationseinheit codieren. In *E. coli* wurden die Proteine TatA als Tha4-, TatB als Hcf106- und TatC als cpTatC-Homolog charakterisiert [49, 52, 53]. Diese Proteine liegen zusammen mit einem weiteren Protein TatD auf dem gemeinsamen Operon *tatABCD*. Mit TatE wurde noch ein weiteres homologes Protein entdeckt, welches auf einem getrennten Gen liegt [11, 13, 54, 55].

Die Proteine TatA, TatB und TatC sind in *E. coli* und den meisten anderen Gram-negativen Bakterien [8, 9] für den Tat-abhängigen Transport unabdingbar, da beim Fehlen eines dieser Proteine kein Transport mehr beobachtet wird [13, 47, 56-58]. TatE ist wahrscheinlich durch Genduplikation aus TatA hervorgegangen [9] und hat eine überlappende Funktion mit TatA,

was sich auch an der Tatsache zeigt, dass diese Proteine eine Sequenzhomologie von über 50% aufweisen [55, 59]. Das Fehlen eines dieser beiden Proteine verlangsamt zwar den Transport, aber der Tat-abhängige Translokationsapparat bleibt dennoch funktionsfähig [11]. TatD hingegen ist ein cytoplasmatisches Protein mit DNase-Aktivität und scheint für eine funktionsfähige Tat-Translokase nicht von Bedeutung zu sein [60].

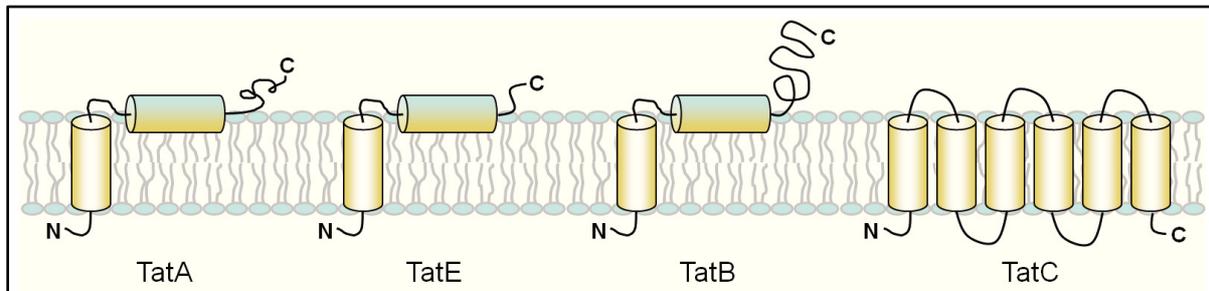


Abb. 3 **Vorhergesagte Struktur der Komponenten des Tat-abhängigen Transports**

Abbildung angefertigt nach der Strukturvorhersage aus [61].

Auch strukturell sind die Proteine TatA, TatB und TatE sehr nahe verwandt (siehe Abb. 3). Strukturvorhersagen aufgrund von Sequenzanalysen bestimmten eine N-terminale transmembrane, gefolgt von einer auf der Membran aufliegenden amphipathischen α -Helix und einem unstrukturierten C-Terminus [55, 61, 62]. Die Ausrichtung in der Membran wird jedoch noch kontrovers diskutiert. Während Porcelli et al. [62] feststellten, dass TatA nur von der cytosolischen Seite für einen protolytischen Verdau zugänglich ist und somit die amphiphile Helix auf dieser Seite liegen muss, zeigten Zugänglichkeitsexperimente an Tata Cystein-Mutanten eine „N-inside“ Topologie [63].

TatC hingegen ist ein sehr hydrophobes Protein mit einem hohen α -helikalen Anteil [64] bestehend aus vier bis sechs vorhergesagten transmembranen Helices, wobei der N- und der C-Terminus auf der cytosolischen Seite liegen [65, 66].

TatA wird als die porenbildende Komponente des Tat-abhängigen Transports betrachtet, da es in einem hohen Überschuss gegenüber den anderen Komponenten exprimiert wird (Expressionsverhältnis in *E. coli* von TatA/TatB/TatC = 25:1:0,5) [55, 67] und gerne Homooligomere bildet [68]. Mehrere Studien zeigten, dass TatA als Tetramer vorliegt und sich für den Transportvorgang zu höheren Homooligomeren zusammenlagern kann [69, 70]. Auch *in vivo* konnte mittels *Single-Molecule Imaging* gezeigt werden, dass TatA-Komplexe aus Tetramereinheiten aufgebaut sind [71]. Sargent et al. [72] konnten einen TatAB-Komplex mit einem etwa 15-fachen TatA-Überschuss und einer Größe von 600 kDa aus *E. coli* isolieren. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an diesem Komplex zeigten erstmals

zylindrische Strukturen mit einem Innendurchmesser von 6,5 nm, welche die Tat-Translokationspore darstellen könnten. Auch die Ausbildung röhrenartiger Strukturen mit einem Innendurchmesser von 6,7 nm wurde bei einer Überexpression von TatA beobachtet [73]. Weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen an detergentsolubilisierten TatA-Komplexen aus *E. coli* zeigten ringförmige Strukturen variabler Größe, welche den Schluss zulassen, dass TatA mittels dynamischer Oligomerisierung in der Lage ist, an die Substratgröße angepasste Poren zu bilden (siehe Abb. 4A) [74]. Die Proteindichte in der Mitte dieser Strukturen war an der cytosolischen Seite erhöht, was eine Art Deckel der Pore darstellen könnte und erklären würde, wie der Protonengradient beim Transport von Substraten bis zu einer Größe von 7 nm [61] aufrecht erhalten werden kann [74]. Auch für TatA_d aus *B. subtilis*, welches in Membranen rekonstituiert wurde, konnte die Ausbildung von Oligomer-Komplexen mit einer Größe von etwa 10 nm nachgewiesen werden, wohingegen in wässriger Umgebung mizellenartige Strukturen vorlagen [75].

Das in den meisten Gram-negativen Bakterien für eine funktionsfähige Tat-Translokase unerlässliche TatB scheint das Verbindungsstück zwischen TatA und TatC darzustellen [76] und bildet mit TatC einen funktionell wichtigen Komplex [69, 77, 78].

TatC hingegen besitzt einige, für eine funktionsfähige Tat-Translokase wichtige, konservierte Aminosäuren auf der cytosolischen Seite [79, 80] und spielt eine bedeutende Rolle bei der Erkennung und Bindung des Signalpeptids [76, 81, 82]. Tarry et al. [83] gelang es, mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen, einen TatBC-Komplex mit einer Länge von 10 - 12 nm zu charakterisieren, welcher ein bis zwei Substratmoleküle gebunden hat (siehe Abb. 4B).

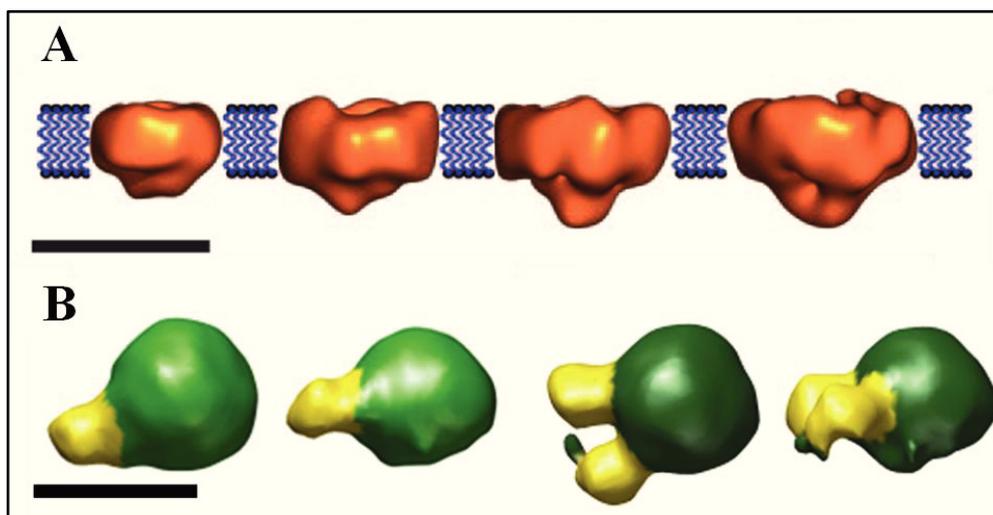


Abb. 4 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines TatA- und eines TatBC-Komplexes

A: TatA-Komplexe mit variabler Größe betrachtet von der Seite.

B: TatBC-Komplex mit einem bzw. zwei gebundenen Substraten jeweils betrachtet von oben und von der Seite.

Abbildung A verändert übernommen aus [74] und Abbildung B aus [83]. Maßstabsbalken: 10 nm

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TatA mit hoher Wahrscheinlichkeit mittels Oligomerisierung die porenbildende Komponente in der Membran darstellt, während TatC für die Erkennung und Bindung des Substrates verantwortlich ist und TatB das Bindeglied zwischen diesen beiden Bauteilen darstellt.

1.3.3 Mechanismus der Tat-abhängigen Translokation

Die Energiequelle des Tat-abhängigen Transports ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die protonenmotorische Kraft, wobei noch nicht abschließend geklärt ist, ob der Transport durch einen pH-Gradienten oder einen elektrischen Feldgradienten angetrieben wird [84]. Die ersten Untersuchungen des Tat-abhängigen Transports in Pflanzen nennen den pH-Gradienten als Triebkraft [7, 85]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass für die Zusammenlagerung von Tha4 mit cpTatC und Hcf106 ein pH-Gradient benötigt wird [86]. In einer weiteren Untersuchung konnte die Menge der Protonen, die pro Proteintransportvorgang herausströmen, bestimmt werden [87]. Die Tatsache, dass der Transport in D₂O langsamer abläuft als in H₂O, zeigt erneut, dass ein Protonenfluss involviert zu sein scheint [88]. Neuere Studien deuten hingegen daraufhin, dass eher der elektrische Feldgradient [89] oder eine Kombination aus pH- und elektrischem Feldgradienten genutzt wird [90]. Im Gegensatz zu diesen *in vitro* Experimenten kamen einige *in vivo* Untersuchungen jedoch zu dem Ergebnis, dass kein pH-Gradient [91], bzw. weder ein pH- noch ein elektrischer Feldgradient [92] benötigt werden. Dies wurde damit begründet, dass hier noch weitere, bisher unbekannte Faktoren, eine entscheidende Rolle spielen müssen. *In vitro* Studien an Vesikeln aus *E. coli* zeigten ebenfalls, dass auch am bakteriellen Tat-System ein pH-Gradient vorhanden sein muss, damit ein Transport stattfinden kann [57, 58]. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass der pH-Gradient bei der Tat-abhängigen Translokation sowohl in Pflanzenzellen als auch im bakteriellen Transportsystem mit hoher Wahrscheinlichkeit eine große Rolle spielt, aber die genaue Wirkungsweise dieser Triebkraft für den Transport ist noch nicht abschließend geklärt.

Auch der genaue Aufbau der Translokationspore und deren Funktionsweise sind bisher noch nicht geklärt. Wie bereits zuvor erwähnt, bildet TatC zusammen mit TatB einen Komplex [69, 77, 78], welcher das Signalpeptid des Substrats binden kann [76, 81-83]. TatA liegt in einem großen Überschuss vor [67] und bildet Homooligomere [68-71], für welche porenartige Strukturen nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 4A) [72-75]. Es wurde demnach vorgeschlagen, dass das Substrat mit seinem Signalpeptid in einem ersten Schritt von dem TatBC-Komplex, welcher in der Membran vorliegt, erkannt wird [86, 93]. Daraufhin lagert

sich dieser Komplex mit einem TatA-Homooligomer zusammen [86, 93], welches sich dynamisch durch die Anzahl der TatA-Moleküle an die Substratgröße anpassen kann [74] und das Substrat durch die Pore transportiert (siehe Abb. 5).

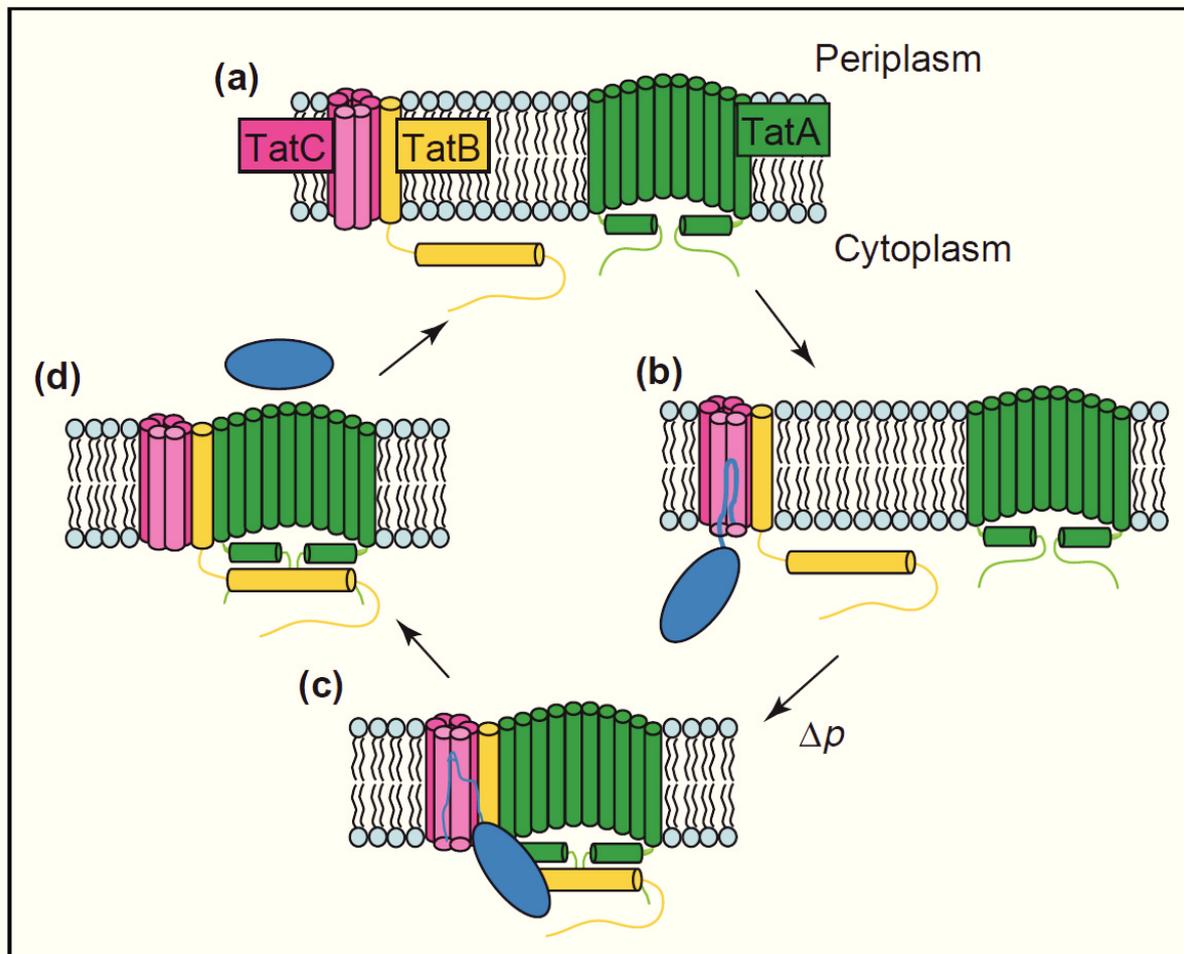


Abb. 5 **Postulierter Mechanismus der Tat-abhängigen Translokation**
Abbildung übernommen aus [93]. Eine Erläuterung des Mechanismus ist im Text gegeben.

Für TatA konnte gezeigt werden, dass die amphiphile Helix wahrscheinlich eine duale Topologie in der Membran einnehmen kann [63, 94]. Hierdurch könnte das Substrat mit einem „Falltür-Mechanismus“ durch die Membran geschleust werden, indem die amphiphilen Helices nach innen in die Membran klappen und durch deren geladenen Aminosäuren eine hydrophil ausgekleidete Pore ausbilden [94, 95] (siehe Abb. 6). Nach dem Transportvorgang wird das Signalpeptid durch Signalpeptidasen abgespalten, wobei das Protein freigesetzt wird, und die amphiphilen Helices klappen wieder in ihre ursprüngliche Orientierung zurück, wodurch sie die Pore verschließen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Translokationskomplex nach Abschluss des Transportvorgangs wieder zerfällt [86].

Mit diesem Mechanismus könnte erklärt werden, wie der Tat-abhängige Translokationsapparat gefaltete Substrate mit einer variablen Größe bis zu 7 nm durch die Membran schleusen und gleichzeitig den Protonengradienten aufrecht erhalten kann.

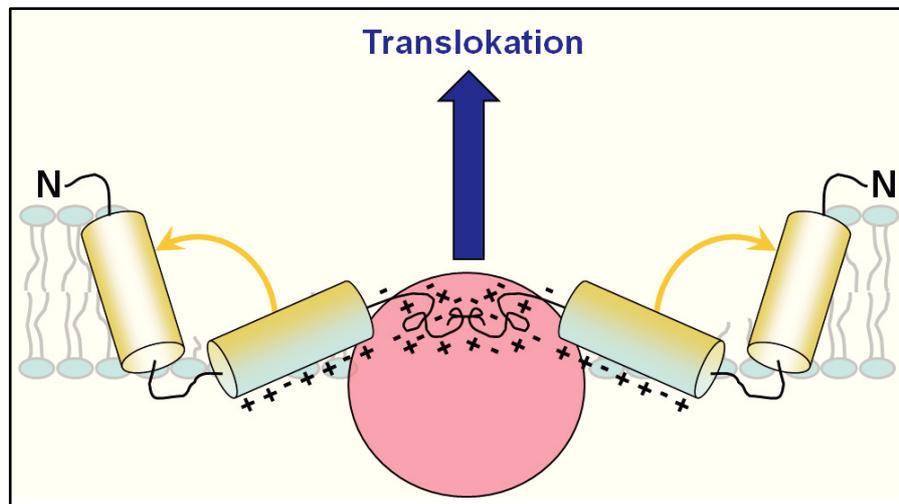


Abb. 6 „Falltür-Mechanismus“ der Tat-abhängigen Translokation
Abbildung basierend auf dem vorgeschlagenen „Falltür-Mechanismus“ [61, 94, 95].

Eine weitere interessante Fähigkeit des Tat-abhängigen Transports ist dessen Qualitätskontrolle, wobei auch hier der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist. Es konnte jedoch für einige Substrate gezeigt werden, dass die Tat-abhängige Translokase nur Substrate akzeptiert, die gefaltet sind [96-98] und ihren Cofaktor gebunden haben [99, 100]. So wird beispielsweise die heterooligomere Hydrogenase 2 aus *E. coli* Tat-abhängig transportiert, obwohl nur eines der beiden Monomere eine Signalsequenz trägt [99]. Es muss also sicher gestellt sein, dass der Transport erst nach der Dimerbildung stattfinden kann, und es zeigte sich, dass selbst das Monomer mit der Signalsequenz alleine transportinkompetent war [99]. Für viele Redoxproteine wurde gezeigt, dass diese erst nach Cofaktor-Bindung transportkompetent werden, und es wurden daraufhin Chaperone entdeckt, welche an das Signalpeptid binden und somit einen Transport des unreifen Proteins verhindern [101-105]. Die Proteine DmsD [105] und TorD [103] stellen beispielsweise die Chaperone für die DMSO- und TMAO-Reduktase dar und befinden sich mit diesen auf einem Operon. Auch für die bereits erwähnte Hydrogenase 2 wurde mit HybE ein Chaperon entdeckt [102, 103], welches einen Transport des unreifen Proteins verhindert. Für das Chaperon DmsD konnte gezeigt werden, dass es mit dem TatBC-Komplex wechselwirkt und somit vielleicht auch das Substrat zur Translokase führt [106]. Ob es solche Chaperone jedoch für alle Tat-Substrate gibt und inwieweit sie einen Einfluss auf den Mechanismus der Tat-abhängigen Translokation haben, ist noch weitgehend unbekannt.

1.3.4 Tat-abhängiger Transport in *Bacillus subtilis*

In *B. subtilis* und vielen weiteren Gram-positiven Bakterien existiert kein TatB [8, 107-110], welches in den meisten Gram-negativen Bakterien für den Tat-abhängigen Transport unabdingbar ist [56] und dort das Bindeglied zwischen TatA und TatC darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass in diesen minimalen Tat-Translokasen TatA die Aufgabe von TatB übernimmt [107, 110-112]. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass TatA_d aus *B. subtilis* in der Lage ist in *E. coli* sowohl TatA/E als auch TatB in den entsprechenden Deletionsmutanten zu ersetzen [112]. Außerdem ist es gelungen in *E. coli* eine TatA-Mutante zu erstellen, welche ebenfalls die Aufgaben von TatB übernehmen kann, und somit konnte auch in diesem Organismus eine minimale Tat-Translokase realisiert werden [111].

Ein weiterer Unterschied besteht in der Tatsache, dass in *B. subtilis* mehrere substratspezifische Kopien der Komponenten des Tat-abhängigen Transports vorliegen [107]. So existieren in diesem Bakterium drei TatA- und zwei TatC-Gene [8, 113], welche jeweils ein spezifisches Transportsystem für ein bestimmtes Protein darstellen [107]. Das Protein PhoD befindet sich beispielsweise mit den Tat-Komponenten TatA_d und TatC_d auf einem Operon [2, 108]. Diese stellen das spezifische Transportsystem für die Phosphodiesterase PhoD dar [108, 113], welches durch eine Signalkaskade bei einem Phosphatmangel induziert wird. Dabei misst die membranintegrierte Histidin-Proteinkinase PhoR die Phosphatkonzentration im Medium, und bei einem Phosphatmangel wird das Regulatorprotein PhoP phosphoryliert, welches das PhoD-Operon induziert [2, 114]. Hierbei wird nun das Präkursorprotein zusammen mit seinem eigenen Transportsystem translatiert. Nach dem Transportvorgang wird das Signalpeptid verzögert von einer Signalpeptidase abgespalten, damit das Protein einige Zeit an der Außenseite der Zelle bleibt [2]. Es konnte gezeigt werden, dass TatA_d und TatC_d funktionsfähig in *E. coli* exprimiert werden können, und dass das Signalpeptid von prePhoD nur von seinem spezifischen, minimalen Transportsystem erkannt wird [108]. Hierzu wurde zu Beginn eine Genfusion des signalpeptidlosen PhoD mit dem Signalpeptid der β -Lactamase erstellt, welche normalerweise Sec-abhängig transportiert wird. Dieses Fusionsprotein wurde ebenfalls Sec-abhängig transportiert, womit gezeigt werden konnte, dass nicht das Substrat die Exportroute determiniert. Ein Fusionsprotein des Signalpeptids von prePhoD mit der signalpeptidlosen β -Lactamase war hingegen transportinkompetent für die Tat-Translokase in *E. coli*. Als jedoch auch zusätzlich die beiden Proteine TatA_d und TatC_d exprimiert wurden, wurde ein Transport beobachtet, wodurch bewiesen wurde, dass das Signalpeptid spezifisch mit seinem Transportsystem wechselwirkt [108].

Die beiden weiteren Tat-Komponenten in *B. subtilis* TatA_y und TatC_y stellen das spezifische Transportsystem für die Peroxidase YwbN dar [107]. Über die Funktion von TatA_c ist bisher nichts bekannt, und diese dritte TatA-Kopie kann weder TatA_d noch TatA_y in den entsprechenden Deletionsmutanten ersetzen [107, 115].

Neben diesen beiden bestätigten Tat-Substraten scheint es mit den Proteinen QcrA und YkuE nur noch zwei weitere mögliche Substrate für den Tat-abhängigen Transport in *B. subtilis* zu geben [43], obwohl durch Sequenzanalysen insgesamt 69 Substrate mit einem potentiellen Tat-abhängigen Signalpeptid entdeckt wurden [44]. Durch ein Reportersystem basierend auf dem *Streptomyces coelicolor* Agarose Protein, welches Tat-abhängig ins Wachstumsmedium sezerniert wird, und dessen extrazelluläre Aktivität colorimetrisch bestimmt werden kann, wurde nachgewiesen, dass die Signalpeptide dieser beiden Proteine ebenfalls einen Tat-abhängigen Transport vermitteln [43]. Dies steht im Einklang mit neueren Untersuchungen, wonach die zuvor postulierte Spezifität der beiden Tat-Translokasen in *B. subtilis* doch weniger stark ausgeprägt zu sein scheint. Eijlander et al. konnten zeigen, dass TatA_y auch durch TatA_d ersetzt und YwbN sogar durch das TatA_dC_d-Translokationssystem sezerniert werden kann, wenn dieses überexprimiert wird [115]. Barnett et al. konnten außerdem zeigen, dass das TatA_dC_d-Translokationssystem auch in *E. coli* exprimiert werden kann und dort das Tat-abhängige Substrat TorA erfolgreich sekretiert [112]. Sie konnten zusätzlich zeigen, dass die Signalpeptide von den *E. coli* Tat-Substraten DmsA, AmiA und MdoD von beiden Tat-abhängigen Translokasen aus *B. subtilis* erkannt werden [116]. Kouwen et al. zeigten, dass beide Tat-Systeme in *B. subtilis* auch als eine Art Überlaufventil für Sec-abhängige Substrate dienen können, wenn diese überexprimiert werden [117].

Auch mechanistisch scheint es in *B. subtilis* einen Unterschied zur Tat-abhängigen Translokation in *E. coli* zu geben. Zum einen konnte gezeigt werden, dass der TatA_d-Komplex bezüglich seiner Größe deutlich weniger heterogen ist, als der entsprechende Komplex in *E. coli* [112, 116]. Dies könnte darin begründet sein, dass die Tat-Translokase in *B. subtilis* an deutlich weniger Substrate angepasst sein muss. Zum anderen wurde für TatA_d beobachtet, dass es nicht nur in der Membran vorliegt, sondern auch mizellenartige Strukturen in wässriger Umgebung ausbilden kann [75, 118]. Außerdem wurde eine Affinität zum Signalpeptid von prePhoD [118] und zu TatC_d [119] beschrieben. Dies lässt einen leicht anderen Mechanismus der Tat-abhängigen Translokation vermuten, wobei TatA_d das Substrat im Cytosol binden und mittels seiner Affinität zum membranständigen TatC_d zur Membran führen könnte [118, 119]. Somit könnte TatA_d vielleicht sogar eine dreifache Funktion im Vergleich zu seinem Homologen in *E. coli* übernehmen, da es als Porenbildner neben der

Brückenfunktion von TatB auch noch die Funktion der teilweise beobachteten Chaperone übernimmt.

Diese minimale Tat-Translokase in *B. subtilis*, welche im Vergleich zur Translokase in *E. coli* deutlich vereinfacht ist, eignet sich demnach besonders für erste Strukturuntersuchungen zur Aufklärung der Tat-abhängigen Translokation.

1.3.5 Bedeutung des Tat-abhängigen Transports

Homologe zu den *E. coli* Tat-Genen wurden in vielen Pathogenen gefunden [8, 9]. So konnte nachgewiesen werden, dass der Tat-abhängige Transport bei den bedeutenden Pathogenen *Pseudomonas aeruginosa* [120], *Mycobacterium tuberculosis* [121-123], *Yersinia pseudotuberculosis* [124], *Vibrio cholerae* [22] und *Legionella pneumophila* [125, 126] eine wichtige Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, dass die für eine Virulenz wichtigen Faktoren, wie zum Beispiel die Exotoxin-Sekretion, Flagellum-Synthese, Phospholipase C-Sekretion, in manchen dieser Organismen auf einen Tat-abhängigen Transport angewiesen sind [127]. Beispielsweise beim enterohämorrhagischen *Escherichia coli* O157:H7, welches blutige Durchfallerkrankungen auslösen kann, spielt der Tat-abhängige Transport bei der Sekretion des Shiga Toxin 1 und bei der Synthese des H7 Flagellin eine wichtige Rolle, wodurch es von entscheidender Bedeutung für dessen Virulenz ist [128].

Da der Tat-abhängige Transport somit eine wichtige Rolle bei der Sekretion von Virulenzfaktoren in Pathogenen spielt, stellt er einen wichtigen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Antibiotika dar [127, 129]. Betrachtet man zusätzlich die weite Verbreitung des Tat-abhängigen Transports in Bakterien und die Tatsache, dass dieser nicht in tierischen oder menschlichen Zellen auftritt, könnte dies einen entscheidenden Vorteil bei der Entwicklung neuer und sicherer Antibiotika darstellen [18, 120, 127].

Auch in Phytopathogenen wie beispielsweise dem *Agrobacterium tumefaciens* [19], *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 [130] und *Ralstonia solanacearum* [131] konnte ein entscheidender Einfluss des Tat-abhängigen Transports auf die Virulenz nachgewiesen werden. Somit könnte der Tat-abhängige Transport auch ein möglicher Angriffspunkt zur Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel sein.

Eine weitere wichtige biotechnologische Bedeutung gewinnt der Tat-abhängige Transport durch seine Fähigkeit gefaltete Substrate zu transportieren. Ein Großteil der biotechnologisch hergestellten Proteine, wie beispielsweise das Humaninsulin, werden durch Expression in Bakterien gewonnen [2]. Somit wären Gram-positive Bakterien, wie beispielsweise *B. subtilis*, durch das Fehlen einer Außenmembran die perfekten Wirtsorganismen für die

biotechnologische Proteinproduktion, da sie zusammen mit der Tat-abhängigen Proteintranslokationseinheit die Proteine im gefalteten Zustand direkt ins Kulturmedium überführen könnten. Auch die Tatsache, dass der Tat-abhängige Transport eine Qualitätskontrolle besitzt und somit nur korrekt gefaltete Proteine sezerniert [96-99], stellt einen weiteren wichtigen Vorteil dar. Bei dem bisher oftmals eingesetzten Sec-abhängigen Transport, welcher die Proteine nur ungefaltet transportieren kann, besteht hingegen oftmals das Problem, dass sich die Proteine im Nährmedium nicht richtig falten [132] oder, noch bevor sie eine stabile Faltung erreichen, wieder abgebaut werden [133]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das *green fluorescent protein* (GFP) nach dem Sec-abhängigen Transport in einer inaktiven Form vorliegt [132], wohingegen der Tat-abhängige Transport in korrekt gefaltetem GFP resultiert [134, 135]. Manchmal sind die Substrate auch einfach inkompatibel zum Sec-abhängigen Transport, da sie sich zu schnell falten und somit die Translokationspore verstopfen. Pop et al. konnten beispielsweise zeigen, dass LacZ in *E. coli* mit einem Tat-abhängigen Signalpeptid in guter Ausbeute ins Periplasma sekretiert werden kann, wohingegen der Sec-abhängige Transport, wahrscheinlich aufgrund der schnellen Faltung und Größe des Proteins, die Poren verstopfte und letztendlich zum Zelltod führte [2, 108]. Die Tatsache, dass der Tat-abhängige Transport recht schnell gesättigt ist [136], könnte man vielleicht durch Überexpression der Tat-Komponenten umgehen [57, 137]. Einen anderen Ansatz verfolgten Gauthier et al. indem sie gleichzeitig den Tat- als auch den Sec-abhängigen Transport nutzten, um eine höhere Ausbeute des sezernierten Proteins zu erhalten [138].

Es konnten schon mehrere heterologe Proteine in verschiedenen Bakterien mit Hilfe des Tat-abhängigen Transports sezerniert werden [139-142]. Für die letztendliche industrielle Nutzung ist jedoch noch ein besseres Verständnis der Funktionsweise und des Aufbaus der Tat-abhängigen Translokase notwendig.

2 Theoretische Grundlagen

Membranproteine übernehmen unter anderem als Rezeptoren, Enzyme, Transporter bedeutende Aufgaben in einer Zelle, und etwa 30% aller Proteine sind in Membranen eingebettet [143]. Obwohl für ein Verständnis der Funktionsweise eines Proteins oftmals die Kenntnis seiner Struktur unabdingbar ist, sind bisher nur recht wenige Strukturen von Membranproteinen bekannt, da sie aufgrund ihrer Hydrophobizität und hohen Aggregationsneigung besondere Ansprüche an die verwendeten strukturellen Methoden stellen. Dies lässt sich auch an der Tatsache zeigen, dass von den über 60.000 in der *Protein Data Bank* (PDB) [22] erfassten Proteinstrukturen nur etwa 250 von Membranproteinen stammen [144]. Zur hochaufgelösten Strukturaufklärung von Proteinen wird hauptsächlich die Röntgenbeugung verwendet, aber auch die Elektronenmikroskopie und vor allem die NMR-Spektroskopie gewinnen eine zunehmende Bedeutung. Insbesondere für Proteine, welche sich nicht kristallisieren lassen und sich somit einer Strukturaufklärung mittels Röntgenbeugung verschließen, bleibt oftmals nur die NMR-Spektroskopie als einzige Möglichkeit zur Strukturaufklärung. So konnten zwischenzeitlich 39 Membranproteinstrukturen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden [145]. Auch die Festkörper-NMR Spektroskopie, welche teilweise eine Strukturbestimmung in Modellmembransystemen und somit im Gegensatz zur Röntgenbeugung in „natürlicher“ Umgebung ermöglicht, gewinnt mit 21 aufgeklärten Membranproteinstrukturen zunehmende Bedeutung [146].

In diesem Abschnitt werden kurz die theoretischen Grundlagen der spektroskopischen Methoden, welche für die Strukturaufklärung des Membranproteins TatA_d in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, erläutert.

2.1 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie liefert als strukturelle Methode alleine keine hochaufgelösten Strukturen von Proteinen, da sie nur globale Informationen zur Verfügung stellt. Dennoch ist sie eine wichtige, ergänzende Methode bei der Strukturaufklärung von Biomolekülen. So wird sie oftmals zu Beginn bei der Untersuchung eines Proteins eingesetzt, da sie eine kostengünstige Methode darstellt, schnelle Ergebnisse liefert und mit sehr kleinen Probenmengen auskommt. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie können die globalen Sekundärstrukturanteile eines Proteins quantitativ bestimmt werden, wenn eine genaue Bestimmung der Proteinkonzentration möglich ist. Dies bedeutet, dass beispielsweise der α -Helix- oder β -Faltblatt-Gehalt einer Proteinstruktur bestimmt werden kann. Es kann aber

keine Aussage darüber getroffen werden, welche Bereiche des Proteins ein bestimmtes Sekundärstrukturelement einnehmen.

Licht besteht aus elektromagnetischen Wellen, welche sich mit Lichtgeschwindigkeit ausbreiten, dabei stehen der elektrische und der magnetische Feldvektor senkrecht aufeinander. Sie beschreiben die periodischen Veränderungen der elektrischen und magnetischen Felder in Raum und Zeit. Betrachtet man eine Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichtes (also entlang des Wellenvektors \vec{k}) so erkennt man beispielsweise bei linear polarisiertem Licht, dass der entsprechende Feldvektor entlang einer Geraden oszilliert, wohingegen er im Falle von zirkular polarisiertem Licht einen Kreis beschreibt. Bei unpolarisiertem Licht hingegen oszillieren die Feldvektoren in allen Ebenen entlang der Ausbreitungsrichtung. Zirkular polarisiertes Licht kann man durch Überlagerung zweier senkrecht zueinander stehender Lichtwellen mit gleicher Amplitude und Wellenlänge aber einer Phasenverschiebung um 90° erhalten. Je nachdem in welche Richtung die Phase verschoben ist, erhält man links oder rechts zirkular polarisiertes Licht. Bei der CD-Spektroskopie wird eine Kombination aus links und rechts zirkular polarisiertem Licht mit gleicher Wellenlänge, Amplitude und Phase verwendet. Die beiden „Teilwellen“ werden sequentiell in die Probe eingestrahlt und ergeben in der Summation wieder linear polarisiertes Licht. Beim Durchgang durch eine optisch aktive Substanz können nun zwei Wechselwirkungen auftreten. Wenn die Substanz einen unterschiedlichen Brechungsindex für links und rechts zirkular polarisiertes Licht aufweist, dann ergeben sich unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten der beiden Wellen, was in einer Drehung der Ebene des polarisierten Lichtes resultiert, wobei der Grad der Drehung von dem Unterschied der beiden Brechungsindizes abhängig ist. Diesen Effekt nennt man die optische Rotationsdispersion (ORD). Der Zirkulardichroismus hingegen basiert auf der unterschiedlichen Absorption von rechts und links zirkular polarisiertem Licht durch die chirale Probe, wobei elliptisch polarisiertes Licht entsteht. Betrachtet man nun wieder eine Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichtes, so erkennt man, dass der Feldvektor durch die unterschiedliche Absorption des links und rechts zirkular polarisierten Lichtes nun eine Ellipse beschreibt. Das CD-Signal kommt demnach durch die unterschiedliche Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht zustande, und per Definition nimmt es positive Werte an, wenn die links zirkular polarisierte Komponente stärker absorbiert wird.

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{\Delta A}{c \cdot d} \text{ [mdeg} \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$\Delta\varepsilon$ = molarer zirkularer Dichroismus [mdeg·l·mol⁻¹·cm⁻¹];
 ε_L = molarer Extinktionskoeffizient des links zirkular polarisierten Lichts [mdeg·l·mol⁻¹·cm⁻¹];
 ε_R = molarer Extinktionskoeffizient des rechts zirkular polarisierten Lichts [mdeg·l·mol⁻¹·cm⁻¹];
 ΔA =Extinktion [mdeg]; c = Proteinkonzentration [mol/l]; d = Schichtdicke [cm]

Das CD-Signal wird jedoch häufig nicht als molarer zirkularer Dichroismus $\Delta\varepsilon$ angegeben, sondern als Elliptizität θ mit der Einheit mdeg (d. h. tausendstel Winkelgraden). θ entspricht dem arctan aus dem Quotienten von kleiner (b) und großer (a) Halbachse der Ellipse, welche durch den Feldvektor des elliptisch polarisierten Lichts beschrieben wird (siehe Abb. 7).

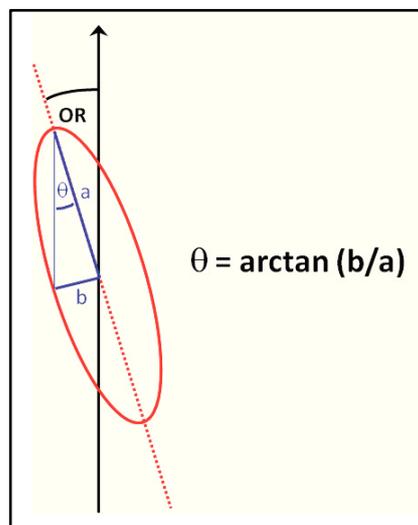


Abb. 7 Definition der Elliptizität θ

Grafik verändert übernommen aus [147].

Ebenfalls gezeigt ist die optische Rotationsdispersion (OR), welche durch unterschiedliche Brechungsindizes für rechts und links polarisiertes Licht hervorgerufen wird und eine Drehung der Ebene des polarisierten Lichtes verursacht.

Bei Proteinen wird die Elliptizität häufig als *Mean Residue Ellipticity* (MRE) angegeben, was der mittleren molaren Elliptizität pro Peptidbindung entspricht und somit ein Vergleich von Spektren verschiedener Proben erlaubt [148].

$$[\theta]_{MRE} = \frac{\theta}{10 \cdot c_r \cdot d} \text{ [deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimol}^{-1}\text{]}$$

$$c_r = \frac{n \cdot c_g}{M_w} \text{ [mol} \cdot \text{l}^{-1}\text{]}$$

θ = Elliptizität [mdeg]; M_w = Molekulargewicht des Proteins [g/mol]
 n = Anzahl der Peptidbindungen; c_g = Proteinkonzentration [g/l]; d = Schichtdicke [cm]

Damit der Zirkulardichroismus überhaupt auftreten kann, muss die Substanz ein Chromophor in der Nähe des chiralen Zentrums besitzen. Bei Proteinen ist dies durch die Peptidbindung in der Nähe des chiralen C_α -Atoms gewährleistet.

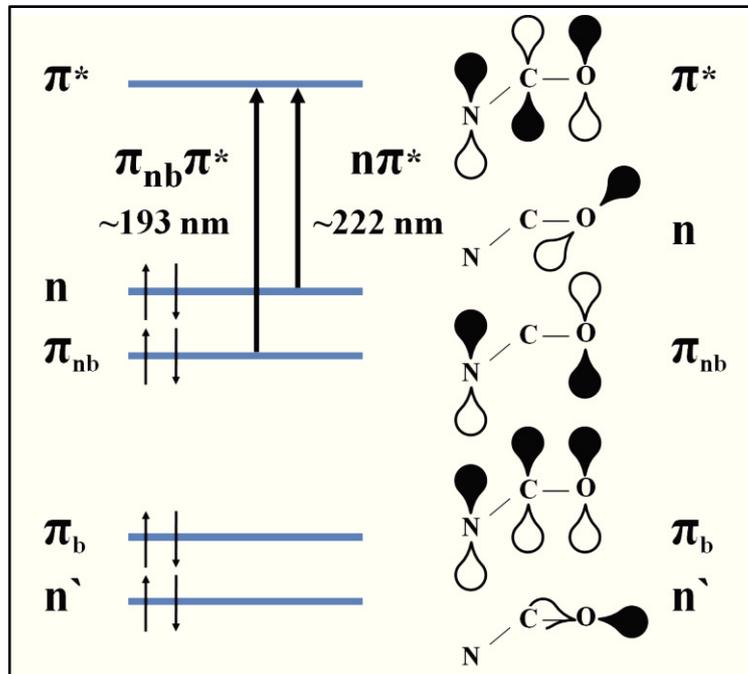


Abb. 8 **Elektronische Übergänge in der Peptidbindung im Fernen-UV-Bereich**

Abbildung erstellt basierend auf einer Vorlage aus [149].

Ein klassisches CD-Spektrum wird von ca. 180 nm bis ca. 300 nm aufgenommen, und in diesem Bereich werden in einer Peptidbindung die Übergänge vom nichtbindenden π -Orbital und vom n -Orbital des freien Elektronenpaares des Sauerstoffs in das antibindende π^* -Orbital mit einer Wellenlänge von ca. 193 nm bzw. ca. 222 nm angeregt (Abb. 8). Durch die unterschiedlichen Orientierungen der Peptidbindungen in den Sekundärstrukturelementen der Proteine verursachen diese nun ganz charakteristische CD-Spektren (Abb. 9). Da ein experimentell erhaltenes Spektrum aber eine Überlagerung aller im Protein vorkommenden Sekundärstrukturelemente darstellt, müssen die Spektren dekonvolviert werden. Hierzu wurden unterschiedliche Algorithmen entwickelt, die auf verschiedenen mathematischen Ansätzen beruhen. Zur Dekonvolution ebenfalls erforderlich sind CD-Basispektren-Datensätze. Diese Basisdatensätze oder Referenzdatensätze bestehen aus CD-Spektren von Proteinen, deren fraktionale Anteile an Sekundärstrukturelementen schon aus der Röntgenkristallographie oder aus NMR-Untersuchungen bekannt sind. Aus diesen Informationen lassen sich die CD-Spektren der reinen Sekundärstrukturelemente berechnen. Mit Dichroweb steht ein Web-Service zur Auswertung mit unterschiedlichen Algorithmen

und Basisdatensätzen zur Verfügung [150]. Ein „Fit“ der gemessenen Spektren mit dem aus einem Basisdatensatz erhaltenen Spektren der reinen, entsprechend gewichteten Sekundärstrukturelemente, ergibt letztendlich den fraktionalen Gehalt der im Protein enthaltenen Faltungsmotive.

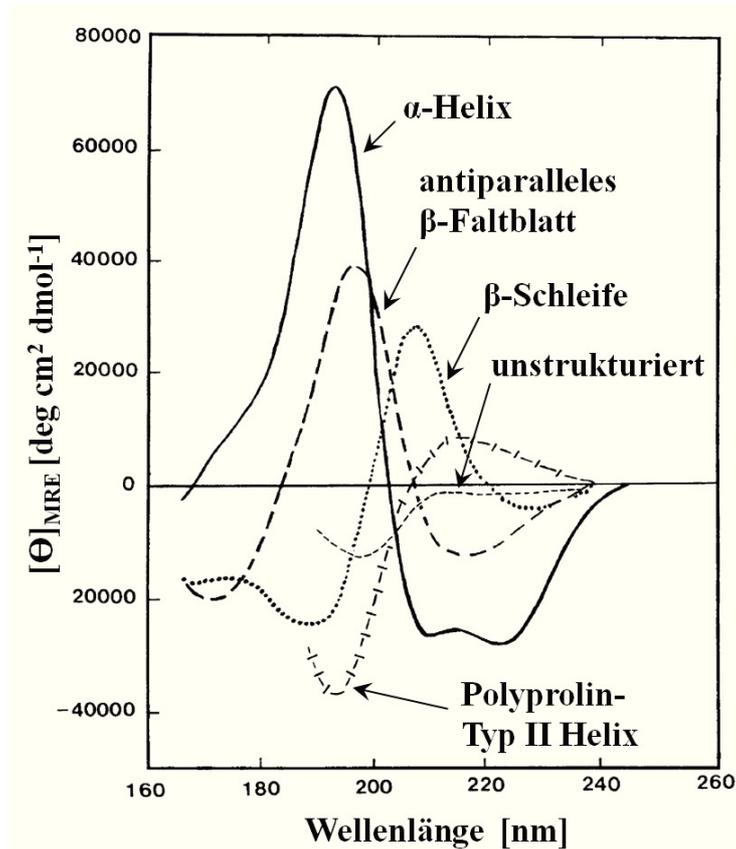


Abb. 9 **Berechnete CD-Basispektren der reinen Sekundärstrukturelemente**
Abbildung verändert übernommen aus [148].

2.2 Orientierte CD-Spektroskopie

Eine Variante der CD-Spektroskopie stellt die orientierte CD-Spektroskopie (OCD) dar, bei der das Protein in orientierten Lipidmembranen rekonstituiert wird. Sie gibt z. B. Auskunft über die Schräglage einer α -Helix in einer Membran. OCD basiert auf der Moffitt-Theorie, welche voraussagt, dass manche elektronischen Übergänge einer α -Helix entlang der Helixachse polarisiert sind und somit die Stärke der Absorption abhängig ist von der Orientierung der Helix bezüglich des zirkular polarisierten Lichtes [151]. Auf dieser Grundlage entwickelten Huang et al. die OCD-Spektroskopie, welche es erlaubt die Orientierung α -helikaler Segmente in der Membran zu bestimmen [152]. Hierbei wird das Protein in orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen rekonstituiert und diese dann in einer speziellen Probenkammer (siehe Abb. 10), welche eine genaue Einstellung und

Einhaltung der Probenparameter wie Hydratation und Temperatur erlaubt, senkrecht zum Lichtstrahl in das CD-Spektrometer eingebaut. Die Probenkammer ist drehbar im Spektrometer angebracht, um das CD-Spektrum in unterschiedlichen Orientierungen aufnehmen zu können, damit Störungen wie Lineardichroismus und Doppelbrechung abgeschwächt werden.

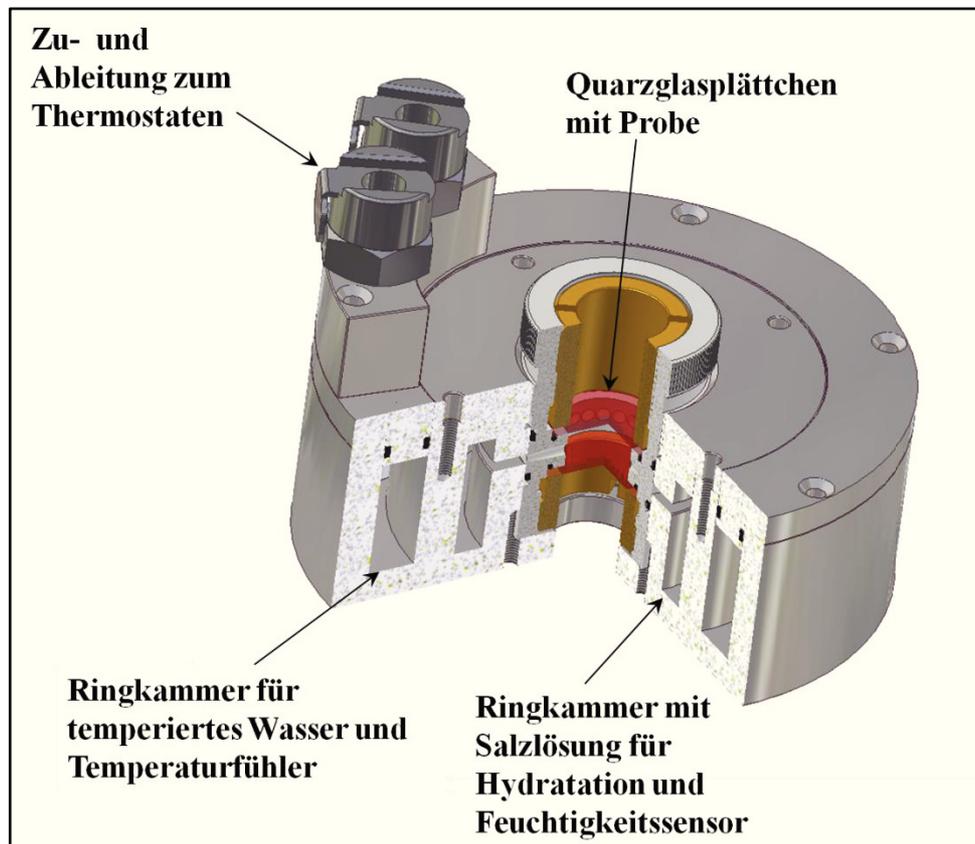


Abb. 10 **Aufbau einer OCD-Meßzelle**

Abbildung erstellt von S. Roth (KIT Karlsruhe).

Eine genaue Beschreibung der OCD-Meßzelle ist in [153] veröffentlicht.

Bei einer α -Helix ergibt sich ein Gesamtübergangsdipolmoment der einzelnen Peptidchromophore parallel oder senkrecht zur Helixachse. Demnach ist die Wechselwirkung des elektrischen Feldvektors des einfallenden Licht mit den (Vektor-addierten) Übergangsdipolmomenten der Peptid-Bindungsorbitale abhängig von der Orientierung der Helix. Für die elektronischen Übergänge existieren Übergangsdipolmomente die entweder senkrecht oder parallel zur Helixachse polarisiert sind und somit für eine uniaxial orientierte Probe, deren Membran senkrecht zum einfallenden Licht orientiert ist, folgende Intensitätsverteilung hervorrufen (siehe Abb. 11).

| Übergang | Orientierung der Helix zur Membran | Wellenlänge [nm] | Linienbreite [nm] | Vorzeichen der Bande |
|-------------|------------------------------------|------------------|-------------------|----------------------|
| $n-\pi^*$ | senkrecht | 224,9 | 11,9 | negativ |
| $n-\pi^*$ | parallel | 222,3 | 12,9 | negativ |
| $\pi-\pi^*$ | senkrecht | 188,5 | 10,1 | negativ |
| $\pi-\pi^*$ | parallel | 204,8 | 7,4 | negativ |
| | | 190,4 | 6,4 | positiv |

Abb. 11 Mögliche CD-Banden einer α -Helix in Abhängigkeit ihrer Orientierung

Abbildung verändert übernommen aus [152].

Wie man erkennen kann, ist das OCD-Spektrum abhängig von der Orientierung der α -Helix zum einfallenden Licht. Der $n-\pi^*$ -Übergang erzeugt sowohl bei der transmembranen als auch bei der flach auf der Membran aufliegenden Orientierung der Helix eine negative Bande bei ca. 224 nm.

Beim $\pi-\pi^*$ -Übergang kommt es hingegen nach der Moffitt-Theorie zu einer dreifachen Aufspaltung der Energieniveaus, wobei ein Übergangsdipolmoment parallel zur Helixachse polarisiert ist. Bei einer flach auf der Membran aufliegenden Helix kommt es nun durch den senkrecht zur Helix einfallenden Lichtstrahl zu einer starken Wechselwirkung des elektrischen Feldvektors mit diesem Übergangsdipolmoment und somit zu einer negativen Bande bei ca. 207 nm. Die beiden anderen Übergänge sind experimentell nicht unterscheidbar und führen zu einer positiven Bande bei ca. 190 nm.

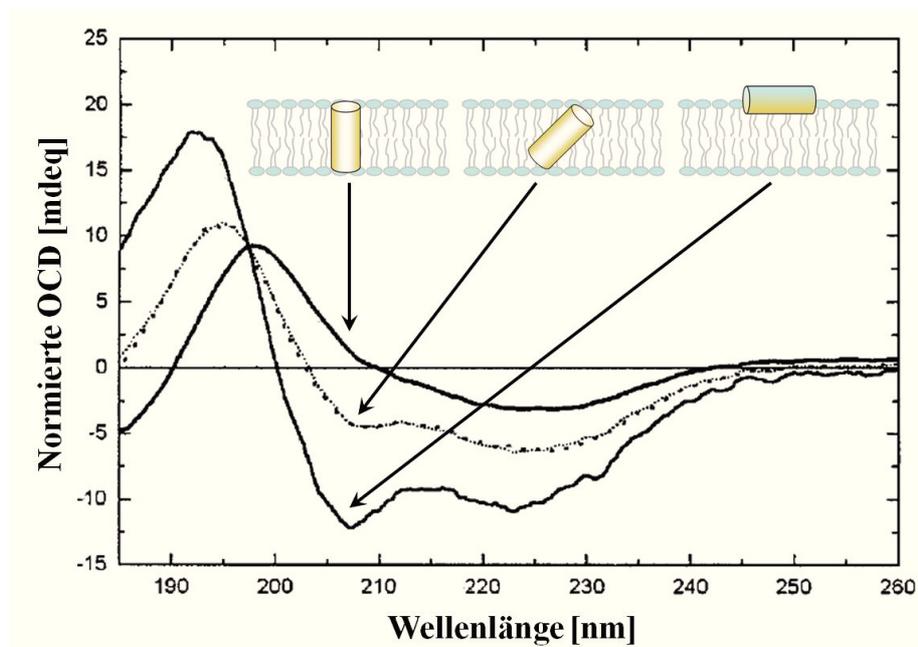


Abb. 12 OCD-Spektren eines α -helikalen Proteins mit transmembraner, schräger und parallel zur Membranoberfläche verlaufender Orientierung

Abbildung verändert übernommen aus [154].

Die Spektren der beiden Orientierungen unterscheiden sich am deutlichsten in der Region um 207 nm (siehe Abb. 12). Ist in dieser „Fingerabdruckregion“ eine negative Bande vorhanden, so ist die Helix parallel zur Membranoberfläche angeordnet. Je weniger stark ausgeprägt diese Bande ist, desto aufrechter ist die Helix in der Membran orientiert.

Wie die CD-Spektroskopie liefert jedoch auch die OCD-Spektroskopie nur eine globale Information, weswegen bei gleichzeitigem Auftreten verschiedener Orientierungen nur ein Mischspektrum erhalten wird.

2.3 NMR-Spektroskopie

NMR steht für *Nuclear Magnetic Resonance* und bezeichnet die Kernspinresonanzspektroskopie. Bis auf die gg-Kerne (Kerne mit gerader Neutronen- und Protonenzahl) besitzen alle Kerne einen Drehimpuls \vec{I} und sind somit NMR-aktiv. Dieser Drehimpuls, welcher auch als Spin bezeichnet wird, ist eine charakteristische Eigenschaft des betreffenden Kerns, wie auch beispielsweise seine Ladung oder Masse. Durch den Kernspin wird ein magnetisches Moment $\vec{\mu}$ erzeugt, wobei dieses proportional zur Größe des Kernspins ist und die Proportionalitätskonstante das gyromagnetische Verhältnis γ darstellt, welches ebenfalls eine kernspezifische Konstante ist.

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \hbar \cdot \vec{I}; \text{ mit } \hbar = \frac{h}{2\pi}; h = \text{Plancksches Wirkungsquantum}$$

Je nach Vorzeichen des gyromagnetischen Verhältnisses sind das magnetische Moment und der Drehimpuls entweder parallel (positives Vorzeichen), oder antiparallel (negatives Vorzeichen) zueinander ausgerichtet. Ohne äußeres Magnetfeld besitzen alle Zustände des Drehimpulses die gleiche Energie. Stern und Gerlach konnten 1922 nachweisen, dass der Drehimpuls im Magnetfeld nur bestimmte, diskrete Werte annehmen kann [155]. Diese sind durch die magnetische Kernspinquantenzahl m_I gekennzeichnet und können nur die Werte $m_I = I, I-1, \dots, -I$ annehmen ($2I + 1$ mögliche Zustände). Die Energieniveaus sind also gequantelt. Positive Werte bezeichnen im Fall $\gamma > 0$ eine Orientierung parallel zum Magnetfeld (α -Spins) und negative Werte entsprechend eine antiparallele Orientierung (β -Spins). Für Kerne mit einem Kernspin von $I = 1/2$, wie beispielsweise das Proton, ergeben sich somit die beiden möglichen Zustände $I = 1/2$ (α -Spins) und $I = -1/2$ (β -Spins).

Die Energie dieser beiden Zustände ist gegeben nach:

$$\begin{aligned} E_I &= -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = -\gamma \cdot \hbar \cdot \vec{I} \cdot \vec{B} = -\gamma \cdot \hbar \cdot I_z \cdot B_0 \\ E_\alpha &= -\frac{\gamma \cdot \hbar \cdot B_0}{2} \text{ und } E_\beta = \frac{\gamma \cdot \hbar \cdot B_0}{2} \\ \Delta E &= E_\beta - E_\alpha = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 \end{aligned}$$

Für die Energien des Spins im Magnetfeld ist nur die Komponente des Drehimpulses in Magnetfeldrichtung, konventionell als z-Achse des Laborsystems definiert, von Bedeutung. Die Aufspaltung der Energieniveaus nennt man auch die Zeeman-Aufspaltung (siehe Abb. 13).

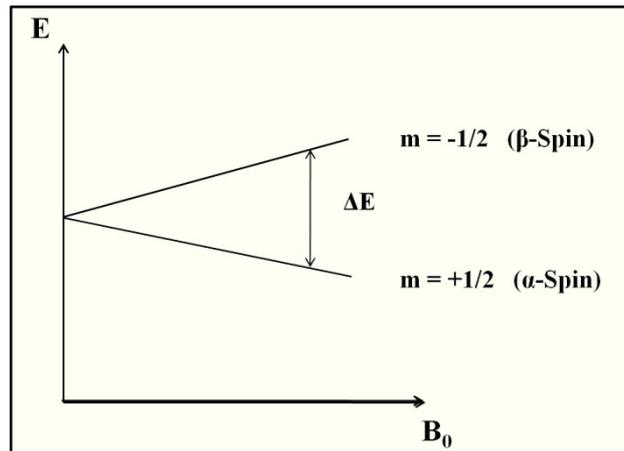


Abb. 13 Kern-Zeeman-Aufspaltung eines Kerns mit dem Kernspin $I = \frac{1}{2}$ im Magnetfeld

Die Energiedifferenz der beiden Zustände ist nur durch die Stärke des Magnetfelds und das gyromagnetische Verhältnis beeinflusst. Für eine große Aufspaltung der Energieniveaus sind demnach möglichst starke Magnetfelder notwendig und auch das gyromagnetische Verhältnis, eine für jeden Kern spezifische Naturkonstante, ist somit von zentraler Bedeutung für die NMR-Spektroskopie.

Der Besetzungsunterschied der beiden Energieniveaus kann durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben werden.

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = e^{-\frac{\Delta E}{k \cdot T}} \approx 1 - \frac{\gamma \cdot \hbar \cdot B_0}{k \cdot T}$$

N_{α} = Zahl der Kerne im Grundzustand; N_{β} = Zahl der Kerne im angeregten Zustand;

k = Boltzmann-Konstante; T = Temperatur

Je größer der Besetzungsunterschied zwischen den beiden Zuständen, desto mehr Kerne können angeregt werden und es folgt demnach eine höhere Signalstärke. Aufgrund der nur kleinen Energiedifferenz zwischen den beiden Spinzuständen ist der Besetzungsunterschied bei der NMR-Spektroskopie nur sehr gering, weshalb es sich in dieser Hinsicht um eine recht unempfindliche spektroskopische Methode handelt.

Damit Spins von einem Energieniveau in das nächsthöhere angeregt werden können, muss die eingestrahlte Strahlung die folgende Resonanzbedingung erfüllen.

$$\Delta E = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 = h \cdot \vartheta$$

$$\rightarrow \vartheta = \frac{\gamma \cdot B_0}{2\pi} \text{ oder } \omega_0 = \gamma \cdot B_0$$

Man erkennt, dass die eingestrahlte Strahlung der Larmorfrequenz ω_0 entsprechen muss, damit das elektromagnetische Feld mit den Kernspins wechselwirken kann und die Kerne

vom α -Zustand in den β -Zustand angeregt werden können. Die Larmorfrequenz ω_0 ist die Frequenz mit der das Kerndipolmoment um das Magnetfeld präzediert (siehe Abb. 14).

Aufgrund der Präzession der Spins hat es sich als hilfreich erwiesen, ein mit der Larmorfrequenz rotierendes Koordinatensystem (*rotating frame*) zu betrachten, wodurch die Gesamtmagnetisierung als statisch betrachtet werden kann (siehe Abb. 14). Die Gesamtheit der Spins ergeben durch den Besetzungsunterschied eine Nettomagnetisierung M_0 entlang der z-Achse.

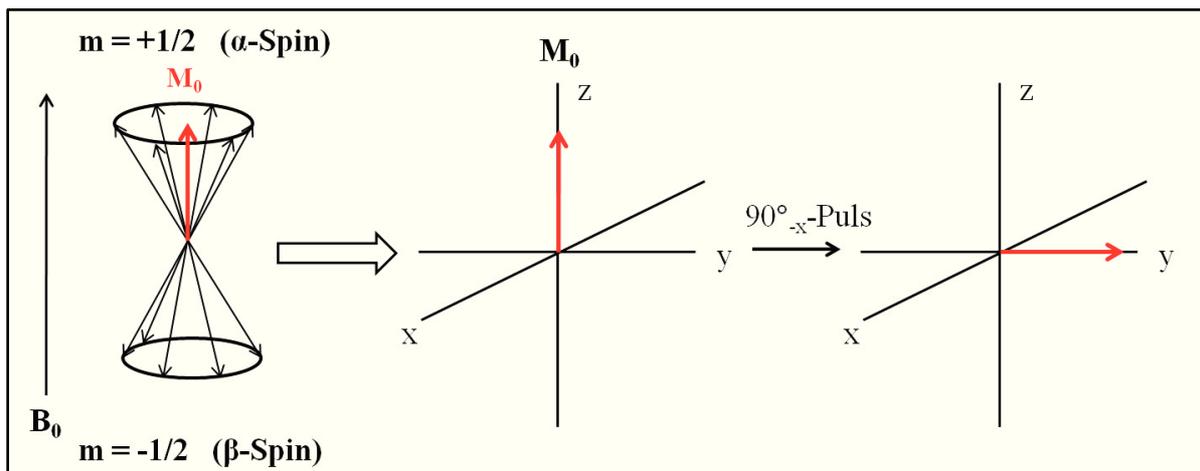


Abb. 14 **Das *rotating frame* und die Vektordarstellung der Gesamtmagnetisierung**

Die Kerndipolmomente μ der Kerne präzedieren aufgrund der Aufspaltung der Energieniveaus in einem Magnetfeld auf einem Doppelkegel. Aufgrund des Besetzungsunterschieds zwischen den beiden Energieniveaus resultiert eine Gesamtmagnetisierung M_0 . Betrachtet man das System auf einem mit der Larmorfrequenz ω_0 rotierenden Koordinatensystems (*rotating frame*), so ist die Gesamtmagnetisierung statisch. Ein B_1 -Feld in x-Richtung kann die Gesamtmagnetisierung in die xy-Ebene klappen (90° -Puls).

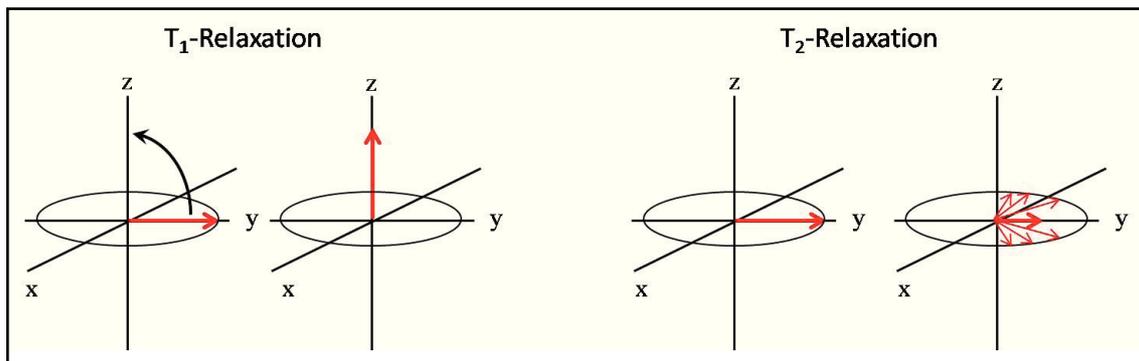
Wird nun mit einem B_1 -Feld mit der Larmorfrequenz und geeigneter Dauer senkrecht zu B_0 eingestrahlt, so kann die Magnetisierung M_0 in die xy-Ebene geklappt werden (90° -Puls). Der Drehwinkel θ der Drehung der Magnetisierung ist abhängig von der Dauer t und der Stärke des eingestrahlteten Feldes B_1 .

$$\theta = t \cdot \omega = t \cdot \gamma \cdot B_1$$

In der xy-Ebene kann diese oszillierende Magnetisierung nun eine Spannung in der Spule induzieren. Das resultierende Meßsignal wird als freier Induktionsabfall (*Free Induction Decay*) bezeichnet und durch Fourier-Transformation kann daraus das NMR-Spektrum gewonnen werden.

Durch Relaxationsprozesse kehrt die Magnetisierung anschließend wieder in den Grundzustand zurück. Wenn die Gesamtmagnetisierung in der xy-Ebene liegt, dann existiert zwischen dem angeregten und dem Grundzustand kein Besetzungsunterschied mehr ($N_\alpha =$

N_β), da durch Kohärenz mit dem eingestrahnten B_1 -Feld so viele Spins angeregt wurden, dass gerade eine Gleichbesetzung der beiden Zustände besteht. Durch das eingestrahlte B_1 -Feld präzedieren diese Spins nun aber in Phase, wodurch die Quermagnetisierung M_y entsteht. Bei der T_1 -Relaxation (Longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxation) relaxieren diese Spins wieder vom angeregten in den Grundzustand, wobei die Gesamtmagnetisierung in z-Richtung wieder zunimmt (siehe Abb. 15). Bei der T_2 -Relaxation (Transversale oder Spin-Spin-Relaxation) hingegen geht die Phasenkohärenz der Spins verloren, wodurch die Gesamtmagnetisierung in der xy-Ebene abnimmt.

Abb. 15 T_1 - und T_2 -Relaxation

2.3.1 Chemische Verschiebung

Das am Kern wirkende Magnetfeld B_{eff} ist nicht identisch mit dem äußeren Magnetfeld B_0 , da es unter anderem durch die Wechselwirkung der Elektronenhülle des betrachtenden Kernes beeinflusst wird. Die Elektronen erzeugen durch ihre Bewegung ebenfalls ein Magnetfeld, welches dem äußeren Magnetfeld meistens entgegen gerichtet ist und somit ein verringertes effektives Magnetfeld ergibt.

$$B_{eff} = B_0 - \sigma \cdot B_0; \text{ mit } \sigma = \text{Abschirmkonstante}$$

Durch das verringerte B_{eff} ergibt sich eine kleinere Energiedifferenz zwischen den beiden Spinzuständen und somit ist auch die Resonanzfrequenz des beobachteten Kernes aufgrund seiner chemischen Umgebung leicht verschoben. Diese Änderung nennt man chemische Verschiebung δ , und diese ist im Vergleich zur Zeemann-Aufspaltung nur sehr klein, weshalb sie in Millionstel der Larmorfrequenz angegeben wird (*parts per million* oder ppm). Die chemische Verschiebung hängt von der Magnetfeldstärke B_0 und somit von einem geräteabhängigen Parameter ab, weshalb sie im Bezug auf eine Referenzsubstanz ausgedrückt wird (zum Beispiel für ^1H Tetramethylsilan und für ^{15}N flüssiger Ammoniak).

$$\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \cdot 10^6; \text{ mit } \nu_0 = \text{Resonanzfrequenz der Referenz}$$

In der Flüssigkeits-NMR Spektroskopie ist die Richtungsabhängigkeit der chemischen Verschiebung durch die schnelle Bewegung der Moleküle ausgemittelt. Man kann hier also nur die isotrope chemische Verschiebung messen (siehe Abb. 16).

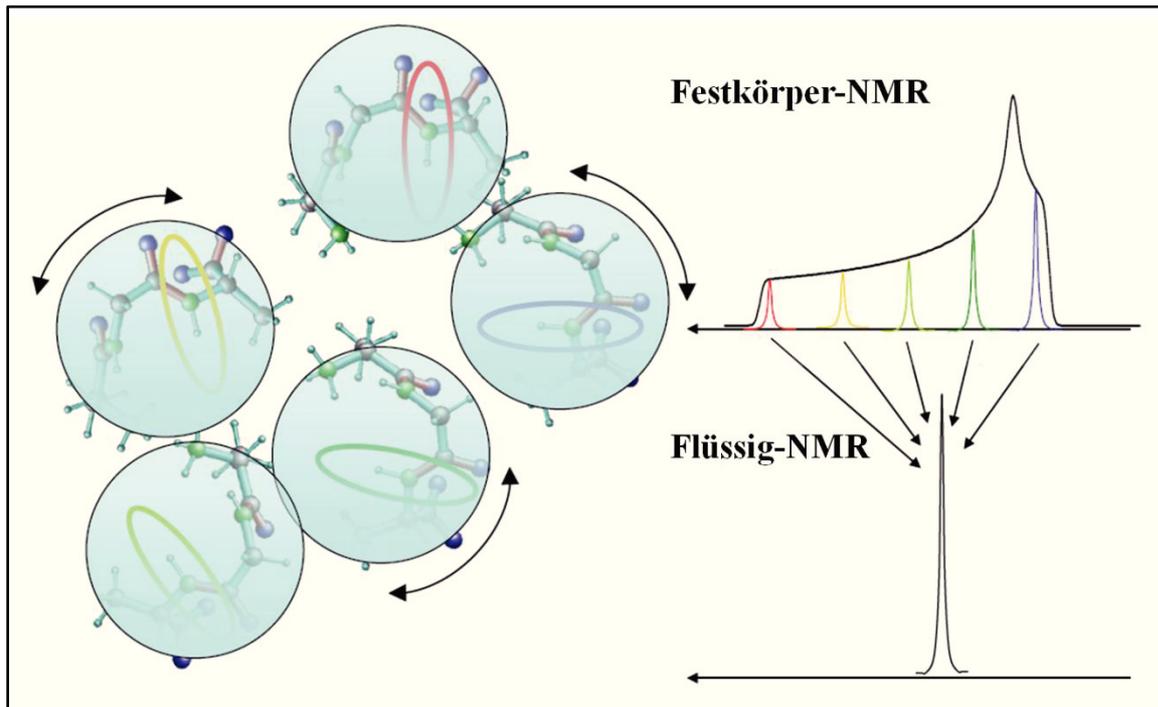


Abb. 16 Die isotrope chemische Verschiebung
Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Stephan Grage, KIT Karlsruhe.

In der Festkörper-NMR Spektroskopie erhält man hingegen ein Pulverspektrum, welches aus den Signalen aller möglichen Orientierungen aufgebaut ist (siehe farblich markierte Linien im Pulverspektrum und entsprechend markierte Kerne in Abb. 16). Ein solches Pulverspektrum enthält trotz seiner breiten Linienform sehr viel Information und es kann durch folgende Parameter charakterisiert werden (siehe Abb. 17).

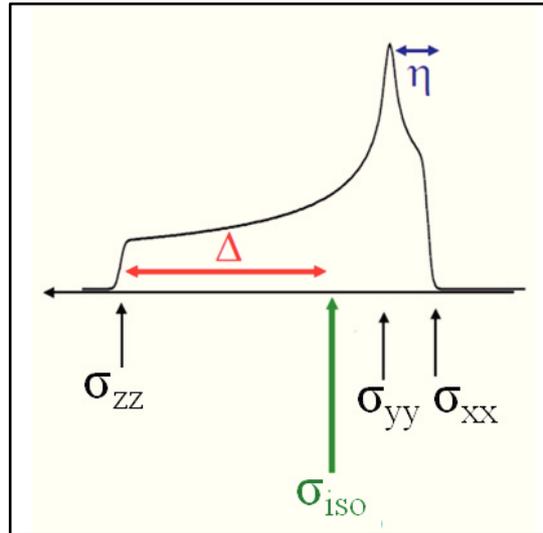


Abb. 17 Das Pulverspektrum

Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Stephan Grage, KIT Karlsruhe.

Die Werte σ_{zz}^{PAS} , σ_{yy}^{PAS} , σ_{xx}^{PAS} stellen die Hauptachsenwerte des chemischen Abschirmungstensors im Hauptachsensystem dar (vergleiche Abb. 18). Der Asymmetrie-Parameter η beschreibt die Abweichung von einem axialsymmetrischen Tensor ($\eta = 0$), bei dem die Hauptachsenwerte σ_{yy} und σ_{xx} zusammenfallen (z. B. bei unorientierten Phospholipidvesikeln).

$$\eta = \frac{\sigma_{yy}^{PAS} - \sigma_{xx}^{PAS}}{\sigma_{zz}^{PAS} - \sigma_{iso}}$$

Die Anisotropie Δ kann folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$\Delta = \sigma_{zz}^{PAS} - \sigma_{iso}$$

Die isotrope chemische Abschirmung kann ebenfalls aus den Hauptachsenwerten berechnet werden.

$$\sigma_{iso} = \frac{\sigma_{xx}^{PAS} + \sigma_{yy}^{PAS} + \sigma_{zz}^{PAS}}{3}$$

Um die Richtungsabhängigkeit der chemischen Verschiebung mathematisch zu behandeln, kann die Abschirmungskonstante als eine 3 x 3 Matrix σ ausgedrückt werden.

$$B_{ind} = -\sigma \cdot B_0$$

$$\begin{pmatrix} B_{ind,x} \\ B_{ind,y} \\ B_{ind,z} \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} B_{0x} \\ B_{0y} \\ B_{0z} \end{pmatrix}$$

Dieser sogenannte chemische Verschiebungstensor (oder auch CSA-Tensor für *chemical shift anisotropy*) kann durch ein Ellipsoid veranschaulicht werden (siehe Abb. 18).

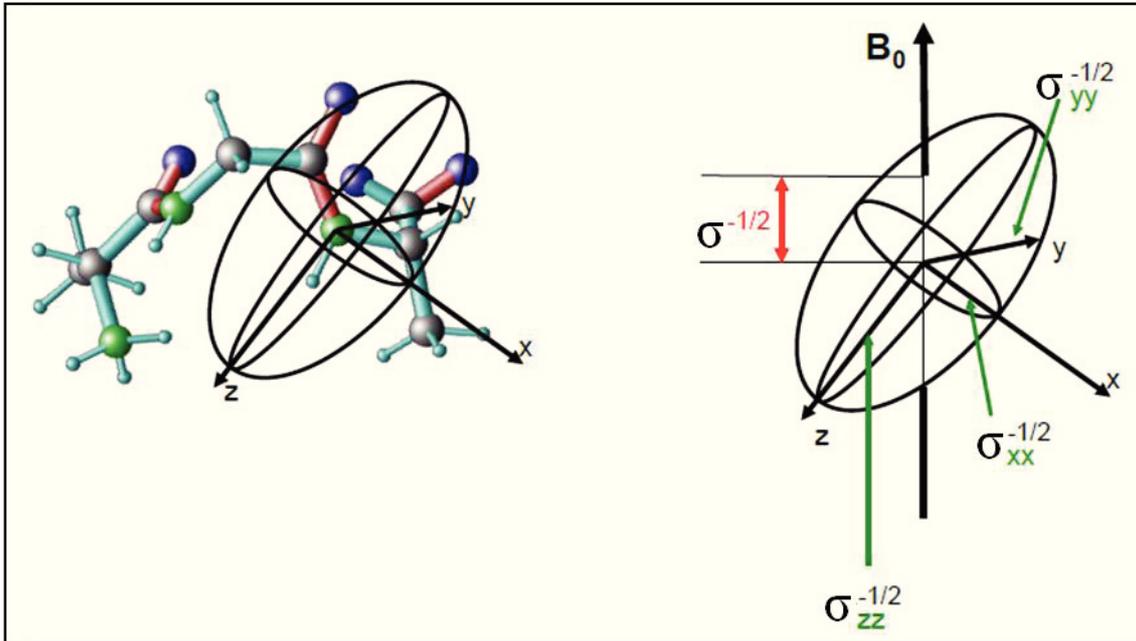


Abb. 18 **Tensor-Ellipsoid im PAS-System**

Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Stephan Grage, KIT Karlsruhe.

Verwendet man als Koordinatensystem das Hauptachsensystem (PAS-System für *principal axes system*) dann liegen die Hauptachsen des Ellipsoids genau auf den Achsen des Koordinatensystems, was bedeutet, dass alle Tensorelemente außer den Diagonalelementen null werden.

$$\begin{pmatrix} B_{ind,x}^{PAS} \\ B_{ind,y}^{PAS} \\ B_{ind,z}^{PAS} \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \sigma_{xx}^{PAS} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{yy}^{PAS} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{zz}^{PAS} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} B_{0x}^{PAS} \\ B_{0y}^{PAS} \\ B_{0z}^{PAS} \end{pmatrix}$$

Die Diagonalelemente des Tensors können aus einem Pulverspektrum bestimmt werden (vergleiche Abb. 17). In dem PAS-System ist die Orientierung des Magnetfeldes B_0 im Allgemeinen nicht mehr in Richtung der z-Achse ausgerichtet (siehe Abb. 18). Diese Bedingung erfüllt jedoch das Laborkoordinatensystem.

$$\begin{pmatrix} B_{ind,x}^{LAB} \\ B_{ind,y}^{LAB} \\ B_{ind,z}^{LAB} \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \sigma_{xx}^{LAB} & \sigma_{xy}^{LAB} & \sigma_{xz}^{LAB} \\ \sigma_{yx}^{LAB} & \sigma_{yy}^{LAB} & \sigma_{yz}^{LAB} \\ \sigma_{zx}^{LAB} & \sigma_{zy}^{LAB} & \sigma_{zz}^{LAB} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ B_{0z}^{LAB} \end{pmatrix}$$

Da in diesem Koordinatensystem das Magnetfeld B_0 in Richtung der z-Achse ausgerichtet ist, bleibt nur die Komponente B_{0z} des Magnetfeldvektors bestehen.

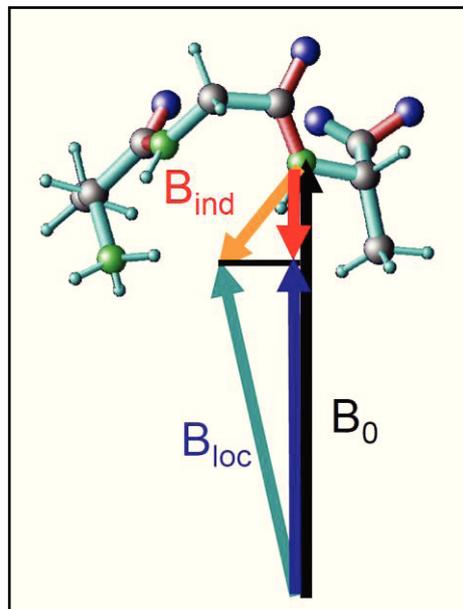


Abb. 19 **Säkulare Näherung**

Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Stephan Grage, KIT Karlsruhe.

Das induzierte Magnetfeld B_{ind} ist sehr viel kleiner als das äußere Magnetfeld B_0 (siehe Abb. 19). Somit ist das am Kern wirkende Magnetfeld B_{eff} praktisch parallel zu B_0 , und es reicht aus, die in zz -Richtung wirkende Komponente des induzierten Magnetfeldes zu betrachten (Sekulare Näherung):

$$B_{ind}^{LAB} = -\sigma_{zz}^{LAB} \cdot B_{0z}^{LAB}$$

Die Resonanzfrequenz wird demnach im Laborkoordinatensystem nur durch die σ_{zz} -Komponente bestimmt.

$$B_{eff}^{LAB} = B_0^{LAB} - \sigma_{zz}^{LAB} \cdot B_0^{LAB}$$

$$\omega = \omega_0 - \sigma_{zz}^{LAB} \cdot \omega_0$$

Folglich ist jetzt also der Tensor im Hauptachsensystem (3 Hauptachsenwerte bekannt aus Pulverspektrum) gegeben, und die σ_{zz} -Komponente des Tensors im Laborsystem wurde durch die gemessene Resonanzfrequenz bestimmt. Zur Bestimmung der Molekülorientierung ist nun also eine Koordinatentransformation vom Hauptachsensystem ins Laborsystem erforderlich.

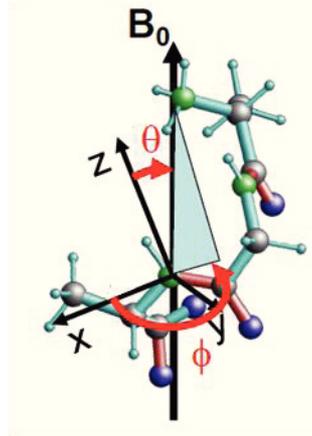
Abb. 20 **Polarkoordinatentransformation**

Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Stephan Grage, KIT Karlsruhe.

Die Winkel ϕ und θ stellen die Polarkoordinaten von B_0 im Hauptachsensystem dar (siehe Abb. 20) und ermöglichen über folgende Beziehung die Koordinatentransformation:

$$\sigma_{zz}^{LAB} = \sigma_{xx}^{PAS} \cdot (\cos\phi \cdot \sin\theta)^2 + \sigma_{yy}^{PAS} \cdot (\sin\phi \cdot \sin\theta)^2 + \sigma_{zz}^{PAS} \cos^2\theta$$

$$\sigma_{zz}^{LAB} = \frac{\Delta}{2} \cdot (3\cos^2\theta - 1 - \eta \cdot \sin^2\theta \cos 2\phi) + \sigma_{iso}$$

Für einen axialsymmetrischen Tensor gilt die folgende Vereinfachung:

$$\sigma_{zz}^{LAB} = \frac{\Delta}{2} \cdot (3\cos^2\theta - 1) + \sigma_{iso}$$

Somit sind nun beide Koordinatensysteme in Beziehung zueinander gesetzt, und es kann die Orientierung des Tensors im Magnetfeld berechnet werden.

2.3.2 Skalare Kopplungen

Skalare Kopplungen spielen hauptsächlich in der Flüssigkeits-NMR eine wichtige Rolle, weshalb sie hier nur kurz erwähnt werden, da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Festkörper-NMR liegt. Die skalare Kopplung wird auch häufig als indirekte Spin-Spin-Kopplung bezeichnet, da sie über die Bindungselektronen vermittelt wird. Hierbei werden die magnetischen Wechselwirkungen über die Bindungselektronen von einem Kern auf den anderen übertragen. Somit kommt es zu charakteristischen Aufspaltungen der Signale im Spektrum. Betrachtet man beispielsweise ein Proton, welches mit einem Nachbarproton koppelt, so kann sich dieses entweder im α -Spin- oder β -Spin-Zustand befinden. Somit wird

das effektive Magnetfeld des beobachteten Kernes in einem Fall abgeschwächt und im anderen Fall verstärkt, wodurch das Signal in ein Duplett aufspaltet. Allgemein kann die Multiplizität M der Signalaufspaltung durch n benachbarte Kerne mit $M = 2nI + 1$ angegeben werden, und die Signalintensität folgt dem Pascalschen Dreieck. Die Kopplungskonstante J wird in Hertz angegeben und entspricht dem Abstand zweier benachbarter Linien des Multipletts. Die Kopplungskonstante ist unabhängig von der Magnetfeldstärke und kann über mehrere Bindungen reichen. Eine hochgestellte Ziffer vor der Kopplungskonstante gibt hierbei die Anzahl der Bindungen an die zwischen den koppelenden Kernen liegt (zum Beispiel 2J für geminale Kopplungen oder 3J für vicinale Kopplungen). Insbesondere die vicinale Kopplungskonstante kann wertvolle Strukturinformationen liefern, da sie beispielsweise vom Diederwinkel abhängig ist. Die sogenannte Karplus-Kurve trägt die 3J -Kopplungskonstante in Abhängigkeit vom Diederwinkel auf. Viele wichtige Experimente in der Flüssigkeits-NMR wie zum Beispiel das COSY- und HSQC-Experiment basieren auf der skalaren Kopplung.

2.3.3 Die dipolare Kopplung

Die dipolare Kopplung wirkt im Gegensatz zu der skalaren Kopplung über den Raum. Deshalb wird sie auch als direkte Spin-Spin-Kopplung bezeichnet. Hierbei beeinflusst das magnetische Moment eines Kernes das effektive Magnetfeld B_{eff} des beobachteten Kernes, wobei sich die Kerne in direkter Nachbarschaft befinden müssen. Die dipolare Kopplung tritt nur im Festkörper auf, da sie in der Flüssigkeit durch die schnelle Molekülbewegungen ausgemittelt ist. Diese Kopplungen liegen im kHz-Bereich und sind somit maßgeblich an den breiten Linien in einem Festkörperspektrum beteiligt.

Der Einfluss der dipolaren Kopplung auf das effektive Magnetfeld kann wieder mit einem Tensor beschrieben werden.

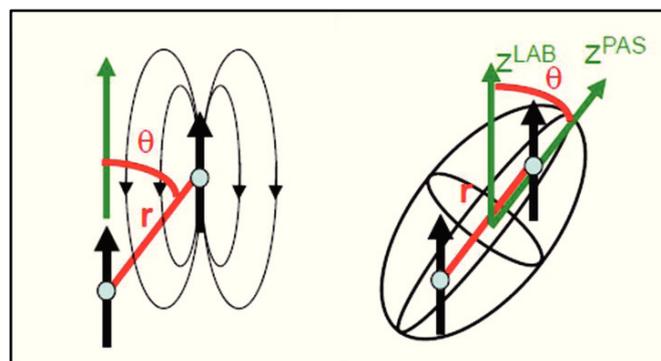


Abb. 21 **Der Dipoltensor**

Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Stephan Grage, KIT Karlsruhe.

Im Laborkoordinatensystem liegt die z-Achse wieder entlang des Magnetfeldes B_0 . Im Hauptachsensystem hingegen liegt z-Komponente entlang der Verbindungsachse der beiden Kerne (siehe Abb. 21). Der Winkel zwischen dieser Verbindungsachse und dem Magnetfeld wird mit θ bezeichnet.

Im Hauptachsensystem gibt es folgenden Zusammenhang.

$$B_{eff} = -DM$$

$$\begin{pmatrix} B_{eff,x}^{PAS} \\ B_{eff,y}^{PAS} \\ B_{eff,z}^{PAS} \end{pmatrix} = \frac{\mu_0}{2\pi \cdot r^3} \begin{pmatrix} -1/2 & 0 & 0 \\ 0 & -1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_x^{PAS} \\ M_y^{PAS} \\ M_z^{PAS} \end{pmatrix}$$

Im Laborsystem ist die Stärke der dipolaren Kopplung in z-Richtung durch folgende Beziehung gegeben.

$$D_{zz}^{LAB} = \frac{\mu_0 \gamma_I \gamma_S}{4\pi \cdot r^3} \cdot \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)}{2}$$

μ_0 = Permeabilitätskonstante des Vakuums; γ_I = gyromagnetisches Verhältnis des Kernes I;
 γ_S = gyromagnetisches Verhältnis des Kernes S; r = Abstand der Kerne; θ = Winkel der Verbindungsachse der beiden Kernen mit dem Magnetfeld

Die Stärke der dipolaren Kopplung ist demnach vom Abstand der beiden Kerne und vom Winkel der Verbindungsachse der beiden Kerne zum äußeren Magnetfeld B_0 abhängig. Die Reichweite der dipolaren Kopplung ist nur sehr gering (mehrere Å) und zu $1/r^3$ proportional. Der Einfluss des Winkels θ zwischen dem Magnetfeld und der Verbindungsachse der beiden koppelnden Kerne ist in Abb. 22 gezeigt. Bei einem Winkel von $\theta = 0$ wird die Kopplungsstärke maximal. Die Verbindungsachse der beiden koppelnden Kerne steht in diesem Fall parallel zum Magnetfeld. Bei einem Winkel von $\theta = 54,7^\circ$ hingegen verschwindet die Kopplung vollständig. Dieser Winkel wird als „Magischer Winkel“ bezeichnet. Betrachtet man nun eine Pulverprobe, so ergibt sich durch die Aufspaltung aufgrund der dipolaren Kopplung eine charakteristische Linienform, welche als Pake-Duplett bezeichnet wird.

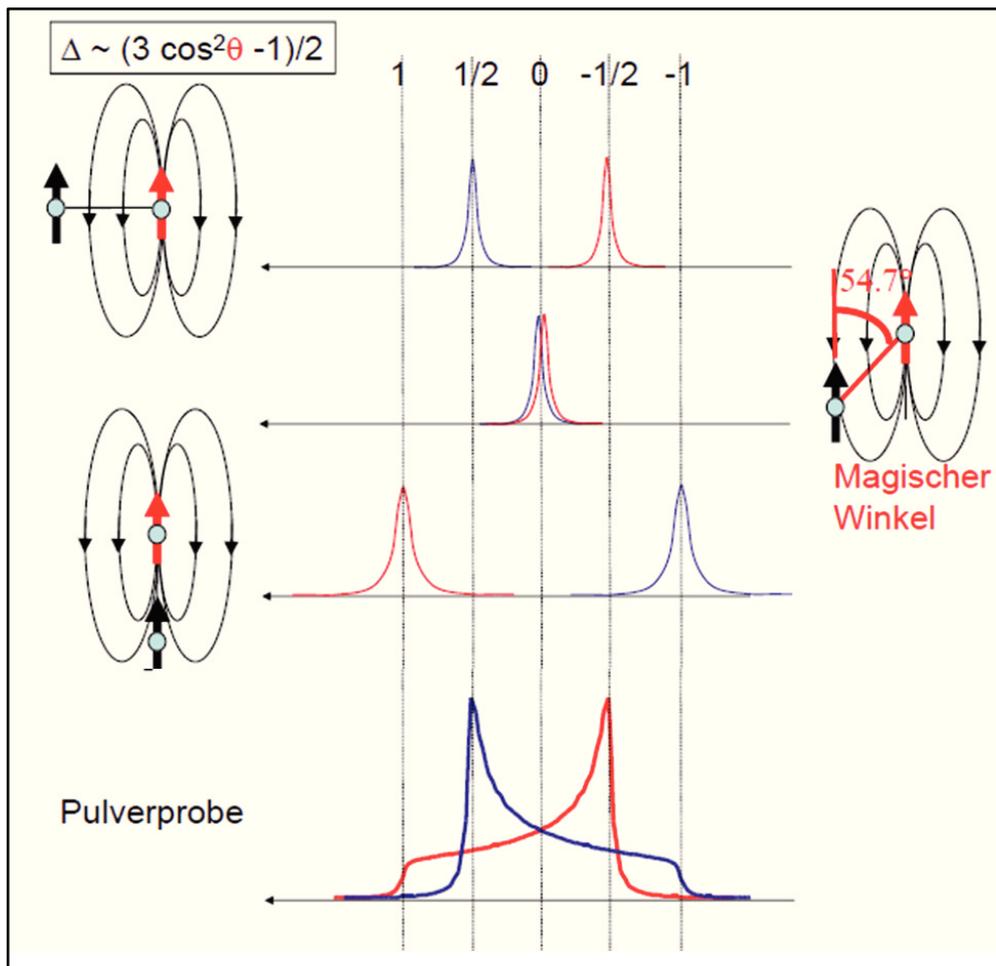


Abb. 22 **Einfluss des Winkels θ auf die dipolare Kopplung**
Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Stephan Grage, KIT Karlsruhe.

2.3.4 Quadrupolaufspaltung

Die Quadrupolaufspaltung tritt nur bei Kernen mit einem Kernspin von $I > 1/2$ auf und somit nicht bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kernen. Deshalb wird nur kurz auf diese Wechselwirkung eingegangen.

Wie die dipolare Kopplung tritt auch die Quadrupolaufspaltung nur im Festkörper auf, da sie in der Flüssigkeit durch die schnellen Molekülbewegungen ausgemittelt wird. Bei Kernen mit $I > 1/2$ herrscht eine nicht sphärische Ladungsverteilung im Kern. Diese asymmetrische Ladungsverteilung ruft ein elektrisches Quadrupolmoment hervor, welches mit dem elektrischen Feldgradienten der Elektronen in Wechselwirkung tritt und somit wieder das am Kern wirkende Magnetfeld B_{eff} beeinflusst. Die Übergänge zwischen den Kern-Zeeman-Energieniveaus sind nun nicht mehr entartet. So kommt es aufgrund der Zeeman-Aufspaltung bei einem Kern mit $I = 1$ zu zwei möglichen Übergängen, welche ohne Quadrupolmoment entartet wären. Liegt jedoch eine Quadrupol-Wechselwirkung vor, resultiert dies in einer

Aufspaltung der Signale. Eine Pulverprobe ergibt wieder die charakteristische Linienform eines Pake-Dupletts. Aufgrund der Orientierungsabhängigkeit der Quadrupolaufspaltung können aus dieser wieder wichtige Strukturinformationen gewonnen werden.

2.4 Festkörper-NMR Experimente zur Proteinstrukturanalyse

Festkörper-NMR Experimente eignen sich sehr gut zur Strukturaufklärung von Membranproteinen, da sie eine Untersuchung des Proteins in einer Membran-imitierenden Umgebung ermöglichen. NMR-aktive Kerne wie ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{17}O und ^{31}P kommen in Biomolekülen natürlich vor. Um beurteilen zu können, welche dieser Kerne sich für eine NMR-spektroskopische Strukturuntersuchung eignen, muss ihre natürliche Häufigkeit, ihr Kernspin und ihr gyromagnetisches Verhältnis betrachtet werden.

| Kern | Kernspin I | gyromagnetisches Verhältnis γ [$\text{T}^{-1}\text{s}^{-1}$] | natürliche Häufigkeit [%] |
|-----------------|------------|---|---------------------------|
| ^1H | 1/2 | $2,6752 \cdot 10^8$ | 99,985 |
| ^2H | 1 | $0,4107 \cdot 10^8$ | 0,015 |
| ^{13}C | 1/2 | $0,6727 \cdot 10^8$ | 1,1 |
| ^{14}N | 1 | $0,1934 \cdot 10^8$ | 99,63 |
| ^{15}N | 1/2 | $-0,2711 \cdot 10^8$ | 0,37 |
| ^{17}O | 5/2 | $-0,3624 \cdot 10^8$ | 0,037 |
| ^{31}P | 1/2 | $1,0829 \cdot 10^8$ | 100 |

Abb. 23 **Eigenschaften NMR-aktiver Kerne in biologischen Proben**

Wie man aus Abb. 23 erkennen kann, würden sich neben Protonen auch ^{31}P sehr gut zur NMR spektroskopischen Untersuchung von Biomolekülen eignen. Jedoch ist ^1H wegen starker Linienverbreiterung durch Dipolkopplung in der Festkörper-NMR nur schlecht aufzulösen und zu interpretieren. ^{31}P hingegen eignet sich sehr gut zur Untersuchung von Phospholipiden in Membranen. Es kommt jedoch nicht in Proteinen vor und kann somit nicht zu deren Strukturaufklärung herangezogen werden. Deuterium, ^{17}O und ^{14}N haben ein Quadrupolmoment und daher breite Linien. Des Weiteren besitzen sie ein niedriges gyromagnetisches Verhältnis und werden daher nur in Spezialfällen verwendet. Die Kerne ^{13}C und ^{15}N sind aufgrund ihres Kernspins von $I = \frac{1}{2}$ gut für die NMR-spektroskopische Strukturaufklärung geeignet. Sie besitzen aber nur eine geringe natürliche Häufigkeit, was jedoch durch eine Anreicherung dieser Isotope bei der Probensynthese, zum Beispiel mittels

bakterieller Expression in Minimalmedium mit einer entsprechenden Isotopenquelle, umgangen werden kann. Insbesondere der Kern ^{15}N eignet sich sehr gut zur Strukturaufklärung von Proteinen, da er in der Peptidbindung isoliert vorliegt und somit keine Linienverbreiterung durch homonukleare Kopplung auftritt. Der Einfluss des kleinen gyromagnetischen Verhältnisses auf die Signalintensität kann durch spezielle NMR-Techniken wie die Kreuzpolarisation (*cross-polarization*, CP) abgeschwächt werden. Hierbei wird Magnetisierung von einem empfindlichen Kern mit großem gyromagnetischem Verhältnis (z. B. ^1H) auf einen unempfindlichen Kern mit kleinem gyromagnetischem Verhältnis (z. B. ^{15}N) übertragen (siehe Abb. 24).

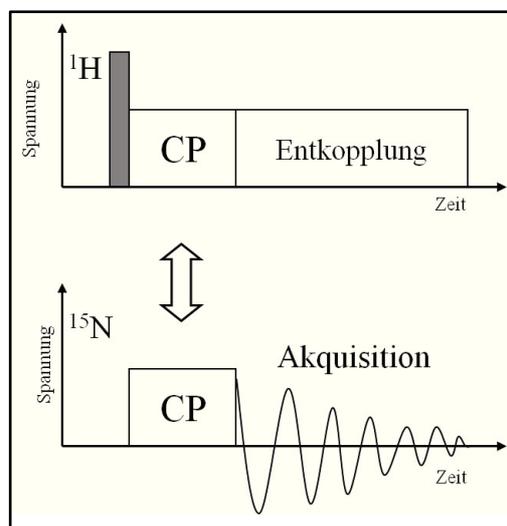


Abb. 24 Kreuzpolarisation
Abbildung verändert übernommen aus [156].

Zu Beginn wird transversale Magnetisierung auf dem empfindlichen Kern durch einen 90° -Puls erzeugt. Nun folgt die Mischzeit bzw. Kontaktzeit, in welcher Magnetisierung zwischen den beiden Kernen ausgetauscht werden kann. Hierzu wird auf beiden Kanälen mit einem B_1 -Feld eingestrahlt, welches die Hartmann-Hahn Bedingung erfüllen muss [157].

$$\gamma_H \cdot B_{1,H} = \gamma_N \cdot B_{1,N}$$

Die Spins sind in dieser Zeit in einem *Spin-Lock* festgehalten und energetisch gekoppelt, wodurch sie Magnetisierung austauschen können. Hierbei nimmt die Magnetisierung der Protonen kaum ab, da sie in einer viel größeren Anzahl vorhanden sind. Die Magnetisierung der ^{15}N -Kerne nimmt hingegen stark zu. Die Signalverstärkung, welche durch Kreuzpolarisation erreicht werden kann, ist proportional zum Quotient der beiden gyromagnetischen Verhältnisse γ_H/γ_N . Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch die Wiederholzeit (*recycle delay*) aufeinander folgender Akquisitionen verkürzt wird, da

diese jetzt nicht mehr von der T_1 -Zeit der ^{15}N -Kerne, sondern nun von der meist kürzeren T_1 -Zeit der Protonen abhängt.

Da die heteronukleare dipolare Kopplung zwischen beobachtetem Kern und umgebender Protonen in Festkörper-NMR Spektren zu breiten Linien führt, muss während der Aufnahme entkoppelt werden. Hierzu wird, während auf dem Stickstoff-Kanal das Signal detektiert wird, auf dem Protonen Kanal mit einem B_1 -Feld größer als der Stärke der dipolaren Kopplung auf die Protonenresonanzfrequenz eingestrahlt. Durch die Entkopplung auf dem ^1H -Kanal sind die beiden Spinzustände der Protonen im zeitlichen Mittel gleichbesetzt, wodurch die Wechselwirkung mit anderen Kernen aufgehoben ist. Da hierzu B_1 -Felder im kHz-Bereich benötigt werden, wird auch von Hochleistungsentkopplung gesprochen.

Zur Bestimmung der Orientierung von Proteinen in der Membran eignet sich sehr gut das $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -PISEMA (*Polarization Inversion Spin Exchange at the Magic Angle*) oder das $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -SAMMY Experiment. Hierbei handelt es sich um SLF (*Separated Local Field*) Experimente, welche es erlauben die ^{15}N chemische Verschiebung mit der ^1H - ^{15}N dipolaren Kopplung zu korrelieren. Hierzu sind spezielle Pulssequenzen notwendig, welche es ermöglichen diese beiden Wechselwirkungen in zwei Frequenzdimensionen getrennt zu betrachten. Bei der PISEMA Pulssequenz [158] wird dies durch Polarizations-Umkehr (PI) und Magnetisierungsaustausch im Magischen Winkel (SEMA) erreicht. Zuerst wird durch Kreuzpolarisation Magnetisierung von den Protonen auf die ^{15}N -Kerne übertragen. Die heteronukleare $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ dipolare Kopplung entwickelt sich während SEMA-Periode in der t_1 -Zeit des 2D Experiments. Hierbei wird die linienverbreiternde homonukleare Protonendipolkopplung und die ^1H chemische Verschiebung unterdrückt, indem die ^1H -Magnetisierung mit einem $35,3^\circ$ Puls im Magischen Winkel bezüglich B_0 angeordnet wird und mit der Lee-Goldburg-Sequenz [159] dort gehalten wird. Außerdem wird während der t_1 -Zeit auch die Entwicklung der chemischen Verschiebung der ^{15}N -Kerne durch einen *Spin-Lock* unterdrückt. Die ^{15}N -chemische Verschiebung entwickelt sich dann während der Akquisition in der t_2 -Zeit, wobei auf dem Protonenkanal hochleistungsentkoppelt wird. Durch die spezielle Pulssequenz während der t_1 -Zeit wird im Vergleich zu konventionellen SLF-Experimenten eine Verringerung der Linienbreite der ^1H - ^{15}N dipolaren Kopplungsdimension erreicht. Da sich die heteronukleare dipolare Kopplung durch den *Spin-Lock* der Protonen im Magischen Winkel mittels der Lee-Goldburg Pulssequenz nicht in voller Stärke entwickeln kann, tritt der unerwünschte Nebeneffekt auf, dass diese Dimension mit einem Skalierungsfaktor von 0,82 skaliert wird. Damit der Magnetisierungsaustausch im Magischen Winkel überhaupt stattfinden kann, muss die Feldstärke des *Spin-Locks* der ^{15}N -Kerne der

effektiven B_1 -Feldstärke der Protonen im Magischen Winkel entsprechen. Die Einstellung der Hartmann-Hahn Bedingung im Magischen Winkel ist jedoch mit Schwierigkeiten verbunden, da die Amidprotonen in einem Protein unterschiedliche Resonanzfrequenzen besitzen. Besonders bei starken Magnetfeldern kann der Resonanzfrequenz-Bereich der Amidprotonen bis zu ca. 10 kHz betragen, wodurch einige Signale im PISEMA-Spektrum schlechter aufgelöst werden können und einen falschen Skalierungsfaktor besitzen [160]. Aus diesem Grund wurde das SAMMY-Experiment entwickelt [160, 161], welches ähnlich zum PISEMA aufgebaut ist und auch die gleichen Informationen liefert, aber anstatt der Lee-Goldburg- eine *magic sandwich*-Pulssequenz [162] zur homonuklearen Protonenkopplung verwendet. Aus diesem Grund ist das SAMMY weniger abhängig von der Protonenresonanzfrequenz und auch leichter aufzusetzen. Die SAMPI4-Pulssequenz stellt eine leicht optimierte Variante des SAMMY-Experimentes dar und wurde für die Messungen in dieser Arbeit verwendet (siehe Abb. 25).

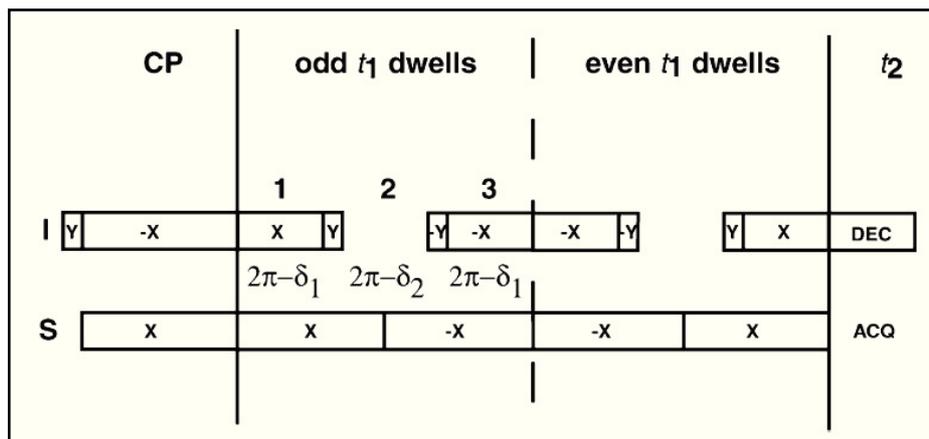


Abb. 25 SAMPI4-Pulssequenz des SAMMY-Experiments

Abbildung übernommen aus [160].

Die erhaltenen Spektren aus diesen SAMMY bzw. PISEMA Experimenten zeigen für α -Helices charakteristische ringförmige Signalmuster, welche als *PISA-wheels* (*Polarity Index Slant Angle*) bezeichnet werden. Jedes Amid im Rückgrat der α -Helix ruft ein Signal in dieser ringförmigen Signalverteilung hervor. Die Lage der Signale wird durch die Orientierung der entsprechenden chemischen Verschiebungstensoren und der Dipoltensoren zum Magnetfeld bestimmt. Die Hauptachse des Dipoltensors fällt mit der NH-Bindung zusammen. Zwischen der Hauptachse des chemischen Verschiebungstensors und der NH-Bindung liegt ein Winkel von $\delta = 18,5^\circ$. Die *PISA-wheels* kommen nun dadurch zu Stande, dass die NH-Bindung nicht exakt parallel zur Helixachse liegt und auch die beiden Tensoren nicht kollinear sind. Bei einer Orientierung von $\tau = 0^\circ$ (Helixachse parallel zum

Magnetfeld B_0) nehmen noch alle NH-Bindungen die gleiche Orientierung zum Magnetfeld ein und alle Signale fallen somit in einem Punkt zusammen. Sobald die Helixachse aber leicht geneigt vorliegt wird diese Symmetrie gebrochen und es entsteht ein *PISA-wheel*. Die größten Dipolkopplungen können bei leicht geneigten Helices beobachtet werden, da nun einige NH-Bindungen und somit auch die Hauptachsen der entsprechenden Dipoltensoren exakt parallel zum äußeren Magnetfeld B_0 ausgerichtet sind, was zu einer maximalen Aufspaltung der Dipolkopplung führt. Wenn eine NH-Bindung im magischen Winkel von $54,7^\circ$ zum Magnetfeld B_0 steht, dann ist seine Dipolkopplung 0 Hz. Für NH-Bindungen, die einen Winkel von $> 54,7^\circ$ zum Magnetfeld einnehmen, kommt es zu einem Wechsel des Vorzeichens der dipolaren Kopplung. Da die SAMMY bzw. PISEMA Spektren symmetrisch bezüglich der Achse mit Dipolkopplung 0 sind, wird nur eine Hälfte des Spektrums gezeigt, wobei die Signale mit umgekehrtem Vorzeichen der Dipolkopplung in das Spektrum „hereingespiegelt“ sind. Anhand der *PISA-wheels* kann also der Kippwinkel τ der betreffenden α -Helix in der Membran ohne Zuordnung der Signale allein durch Auswertung des erhaltenen Signalmusters bestimmt werden (siehe Abb. 26).

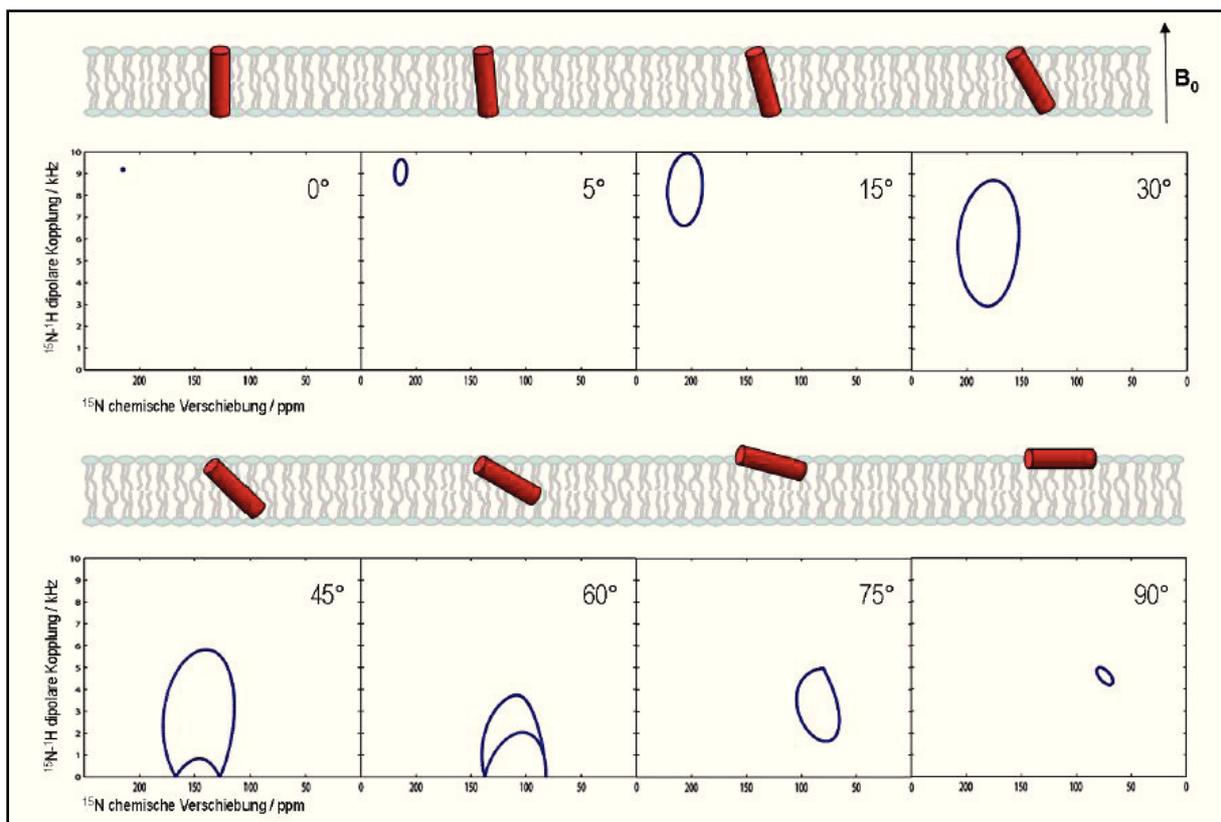


Abb. 26 Orientierungsabhängigkeit des PISA-wheels

Simulierte PISA-wheels für unterschiedliche Tiltwinkel τ .

Abbildung übernommen aus [156].

3 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Strukturaufklärung des porenbildenden Translokationsproteins TatA_d aus *B. subtilis* in Membran-imitierenden Modellsystemen. TatA_d spielt eine Schlüsselrolle im Tat-abhängigen Proteintransport, wobei bisher nur sehr wenig über die genaue Struktur und den molekularen Funktionsmechanismus dieses Transportsystems bekannt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Fragmente des Proteins TatA_d mittels bakterieller Expression dargestellt, aufgereinigt und untersucht werden. Die Fragmente wurden dabei so gewählt, dass sie den einzelnen Sekundärstrukturelementen entsprachen, welche aus Sequenzanalysen vorhergesagt worden waren [51]. An diesen Fragmenten sollten erste Strukturuntersuchungen mittels Zirkulardichroismus (CD) und orientiertem Zirkulardichroismus (OCD) durchgeführt werden. Die CD Ergebnisse sollten dabei erste globale Sekundärstrukturinformationen liefern, wohingegen es die OCD erlaubt, die Orientierung der Fragmente in der Membran zu untersuchen.

Das hieraus erhaltene erste qualitative Strukturmodell von TatA_d sollte nun mit Hilfe von Festkörper-NMR Experimenten in magnetisch orientierten Lipiddoppelschichten (Bizellen) verfeinert werden. Hierzu wurden zweidimensionale SLF (*Separated-Local-Field*)-Experimente wie das ¹⁵N-SAMMY verwendet. Aus den sich daraus ergebenden charakteristischen „PISA-wheels“ sollte die genaue Orientierung der jeweiligen Strukturelemente des Proteins in der Membran bestimmt werden.

Die NMR Spektroskopie in Flüssigkeiten stellt eine komplementäre Methode zur Festkörper-NMR dar, da aus ihr die lokale Proteinstruktur gewonnen werden kann, wohingegen die Festkörper-NMR die Orientierung in der Membran liefert. Ein Vergleich mit Daten aus der Flüssigkeits-NMR sollte, die aus der Festkörper-NMR gewonnen möglichen Orientierungen des Proteins TatA_d in der Membran weiter einschränken. Das sich daraus ergebende Strukturmodell schließt die experimentelle Strukturuntersuchung am TatA_d-Monomer ab.

Da das Protein TatA_d die porenbildende Komponente beim Tat-abhängigen Transport darstellt [69, 72, 74], sollte abschließend noch ein Ausblick auf die Struktur von TatA-Oligomeren gegeben werden. Die Entdeckung charakteristischer Ladungsmotive auf der amphiphilen Helix führte zur Aufstellung eines dreidimensionalen Modells der Poren-Bildung mittels „Charge-Zipping“. In dieser Arbeit wurde somit die Struktur des Proteins TatA_d unter Zuhilfenahme und Kombination verschiedener spektroskopischer Methoden aufgeklärt und ein plausibles 3D-Modell für die Poren-Ausbildung vorgestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Darstellung der TatA_d-Fragmente

Zur strukturellen Charakterisierung von TatA_d wurde eine reduktionistische Vorgehensweise gewählt [163]. Hierzu wurde das Protein in mehrere Fragmente zerteilt (siehe Abb. 27), wobei diese so gewählt wurden, dass sie den einzelnen Sekundärstrukturelementen, welche aus Sequenzanalysen bekannt waren [51, 164], entsprachen.

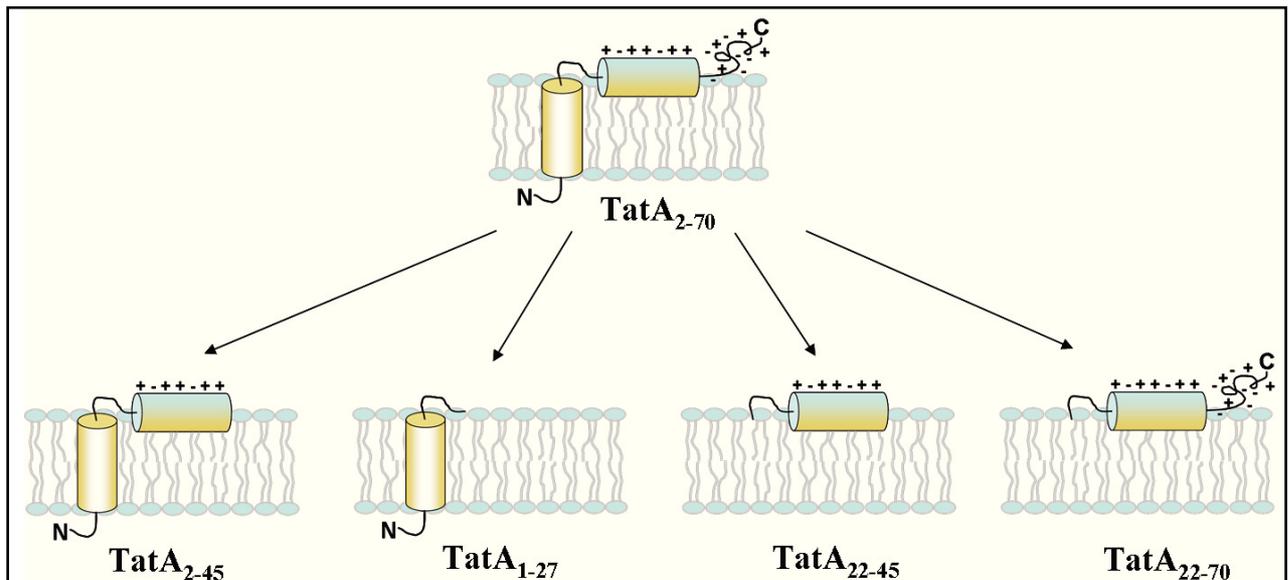


Abb. 27 Schematische Darstellung der TatA_d-Fragmente und deren vorhergesagte Orientierung in der Membran [163]

Zylinder symbolisieren vorhergesagte α -helikale Bereiche.

Die vorhergesagte Struktur des Proteins TatA_d aus *B. subtilis* besteht aus einer N-terminalen hydrophoben transmembranen α -Helix, gefolgt von einer amphiphilen α -Helix und einem unstrukturierten C-Terminus. Die Gesamtlänge des Proteins beträgt 70 Aminosäuren (siehe Abb. 28).

| | | | | |
|---|----|----|----|----|
| 1 | 10 | 20 | 30 | 40 |
| MFSNIGIPGLILIFVIALIIFGPSKLPEIGRAAGRLLLEFKSA | | | | |
| | 50 | 60 | 70 | |
| TKSLVSGDEKEEKS AELTAVKQDKNAG | | | | |

Abb. 28 Aminosäuresequenz des TatA_d aus *B. subtilis*

Die Darstellung der einzelnen Proteinfragmente sollte mittels bakterieller Expression erfolgen, da eine chemische Peptidsynthese für hydrophobe Proteine nur wenig aussichtsreich ist und nur eine rekombinante Expression eine kostengünstige Darstellung von uniform ¹⁵N-

markiertem Probenmaterial für die anschließenden NMR-spektroskopischen Untersuchungen erlaubt.

4.1.1 Darstellung der Expressionsvektoren für die TatA_d- Fragmente

Der Expressionsstamm *E. coli* TG1 pREP4/pQE9-TatA_d [118] wurde von Dr. Jörg Müller (Universität Jena) zur Verfügung gestellt. Die DNA-Sequenz von TatA_d wurde von Dr. Christian Lange (Universität Karlsruhe) in den Expressionsvektor pET-28a(+) (*Novagen*) umklontiert. Der Vektor pET-28a(+) codiert eine Kanamycin-Resistenz und einen N-terminalen His-Tag (Hexahistidin-Anhang). Dieser N-terminale His-Tag dient zur Aufreinigung über eine Ni²⁺-Affinitätssäule und kann später wieder durch eine Bromcyanspaltung abgespalten werden. Diese spaltet C-terminal von Methionin, wodurch die erste Aminosäure des TatA_d zusammen mit dem His-Tag abgetrennt wird.

Aus dem daraus resultierenden Plasmid pET-28-TatA₁₋₇₀ [163] wurden mittels Mutagenese mit Hilfe des Stratagene *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits*, die weiteren Expressionsvektoren für die TatA_d-Fragmente dargestellt (siehe Abb. 29).

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | ATG | TTT | TCA | AAC | ATT | GGA | ATA | CCG | GGC | 10 | TTG | ATT | CTC | ATC | TTC |
| | GTC | ATC | GCC | CTC | ATT | ATT | TTT | GGC | CCT | TCC | AAG | CTG | CCG | GAA | 28 |
| | ATC | GGG | CGT | GCC | GCC | GGA | CGG | ACA | CTG | CTG | GAA | TTT | AAA | AGC | 40 |
| | GCC | ACA | AAA | TCA | CTT | GTG | TCT | GGT | GAT | GAA | AAA | GAA | GAG | AAA | 50 |
| | TCA | GCT | GAG | CTG | ACA | GCG | GTA | AAG | CAG | GAC | AAA | AAC | GCG | GGC | 70 |

Abb. 29 DNA-Sequenz des TatA_d aus *B. subtilis*

Farblich markiert sind alle Codons, die einer Punktmutation zur Darstellung der TatA_d-Fragmente unterzogen wurden:

TatA₂₋₄₅: S₄₆-Codon TCA wird in Stopp-Codon TAA überführt.

TatA₂₂₋₄₅: F₂₁-Codon TTT wird in M₂₁-Codon ATG und S₄₆-Codon TCA wird in Stopp-Codon TAA überführt.

TatA₁₋₂₇: E₂₈-Codon GAA wird in Stopp-Codon TAG überführt.

- **TatA₂₋₄₅**

Als erstes Fragment des Proteins TatA_d sollte ein um den C-Terminus verkürztes Segment dargestellt werden, da der C-Terminus vermutlich unstrukturiert ist und die Aktivität nicht zu beeinflussen scheint [164].

Hierzu wurde das Codon der Aminosäure Serin an der Position 46 mittels Mutagenese mit Hilfe des Stratagene *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* Kits in das Stopp-Codon TAA überführt. Hierbei wurde eine PCR mit Primern (siehe Abb. 30), die die gewünschte Mutation enthalten, durchgeführt [163, 165].

| TatA ₁₋₄₅ fwd | GC | T _m | Länge | M |
|--|--------|----------------|-------|-------------|
| 5'-GCTGGAATTTAAAAGCGCCAC AAAATAACTTGTGTCTGGTGATG-3' | 40,9 % | 80,7 °C | 44 N | 13619 g/mol |

| TatA ₁₋₄₅ rev | GC | T _m | Länge | M |
|--|--------|----------------|-------|-------------|
| 5'-CATCACCAGACACAAGTTATTTT GTGGCGCTTTTAAATTCCAGC-3' | 40,9 % | 80,7 °C | 44 N | 13441 g/mol |

Abb. 30 **pET-28-TatA₁₋₄₅ Mutagenese Primer**
 Rot: eingeführtes Stop-Codon

Nach einem einstündigen Verdau des Elternstranges mit *DpnI* bei 37 °C, wobei nur das mutierte Plasmid zurückbleibt, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt um das Ergebnis der PCR zu überprüfen.

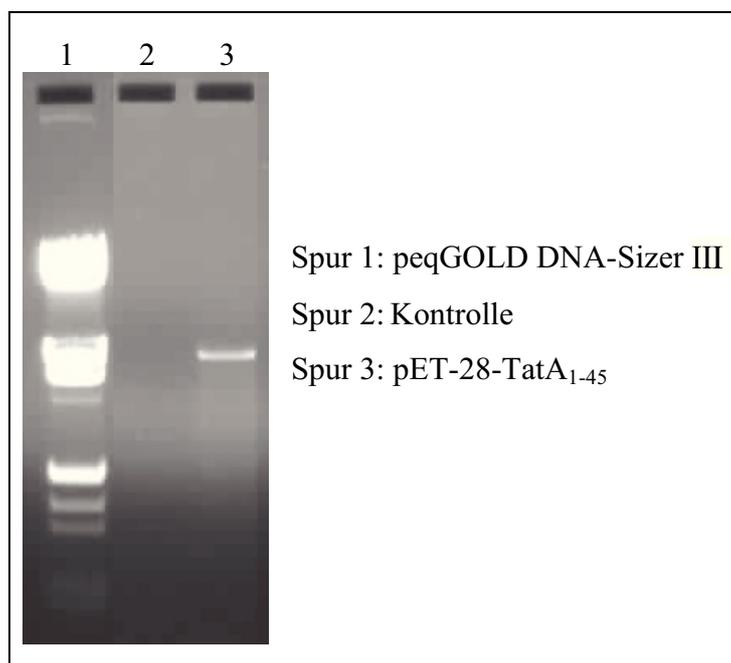


Abb. 31 **Agarosegel der Mutagenese zu pET-28-TatA₁₋₄₅ [165]**

Sowohl die PCR als auch der anschließende Verdau des Elternstranges sind erfolgreich verlaufen ist (siehe Abb. 31). Die Kontrolle (PCR-Ansatz ohne Zusatz von Polymerase) zeigt keine Plasmid-DNA, wohingegen diese im Mutagenese-Ansatz deutlich zu erkennen ist.

Nach der Transformation in *E. coli* XL1-Blue *supercompetent cells* wird das mutierte Plasmid durch die Zellen zu einem Ring geschlossen und man hat das Plasmid mit der gewünschten Mutation vorliegen. Bei einer anschließenden Expression wird nun die Translation bei diesem Stopp-Codon beendet und man erhält ein verkürztes TatA_d. Somit ergibt sich nach der Bromcyanspaltung (Abspaltung des N-terminalen Methionins zusammen mit dem His-Tag) das Protein TatA₂₋₄₅ (siehe Abb. 32).

| | | | | | |
|---|----|----|----|----|----|
| 2 | 10 | 20 | 30 | 40 | 45 |
| F S N I G I P G L I L I F V I A L I I F G P S K L P E I G R A A G R T L L E F K S A T K | | | | | |

Abb. 32 Aminosäuresequenz des TatA₂₋₄₅

- **TatA₂₂₋₄₅**

Als Ausgangspunkt diente das Plasmid des pET-28-TatA₁₋₄₅, welches bereits um den C-Terminus verkürzt ist. Zur Darstellung des amphiphilen Teils musste also nur noch der transmembrane Bereich abgespalten werden. Hierzu sollte ein Methionin zwischen den Transmembranteil und den amphiphilen Teil des Proteins TatA₂₋₄₅ eingefügt werden, um es mit Hilfe der Bromcyanspaltung spalten zu können.

Das Codon der Aminosäure Phenylalanin₂₁ wurde hierzu mittels Mutagenese mit Primern (siehe Abb. 33), die die gewünschte Mutation enthalten, in das Codon für Methionin (ATG) überführt [163, 165].

| TatA ₁₋₄₅ F ₂₁ Mfwd | GC | T _m | Länge | M |
|---|------|----------------|-------|-------------|
| 5'-CGCCCTCATTATTATG ^{Rot} GGC CCTTCCAAGCTGCCGG-3' | 60 % | 81,1 °C | 35 N | 10635 g/mol |

| TatA ₁₋₄₅ F ₂₁ Mrev | GC | T _m | Länge | M |
|---|------|----------------|-------|-------------|
| 5'-CCGGCAGCTTGGAAGG GCC ^{Rot} CATAATAATGAGGGCG-3' | 60 % | 81,1 °C | 35 N | 10871 g/mol |

Abb. 33 pET-28-TatA₁₋₄₅F₂₁M Mutagenese Primer

Rot: eingeführtes Methionin-Codon

Anschließend folgte wieder ein Verdau des Elternstranges mit *DpnI* und eine Agarose-Gelelektrophorese zur Kontrolle der PCR.

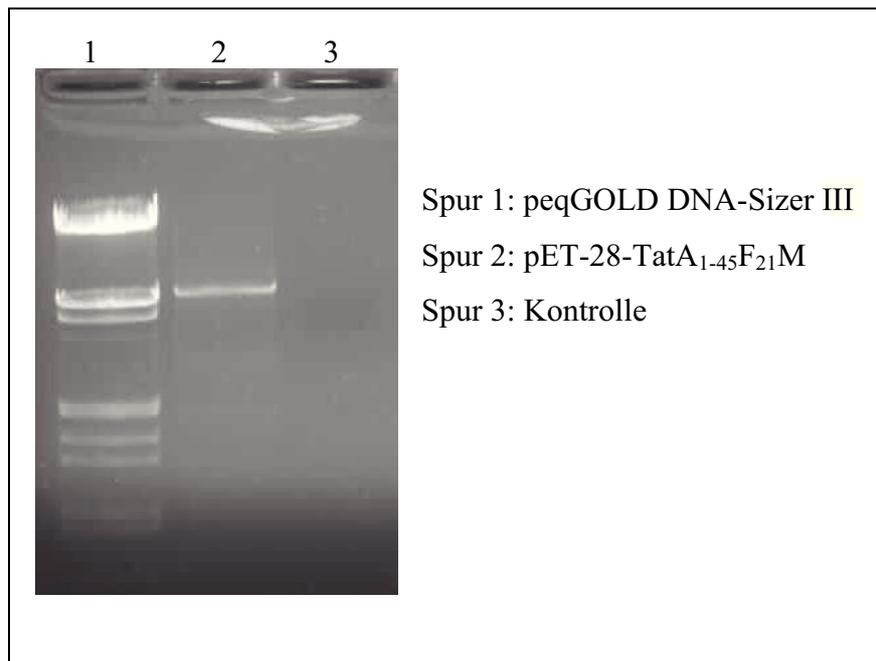


Abb. 34 Agarosegel der Mutagenese zu pET-28-TatA₁₋₄₅F₂₁M [165]

Die PCR und der anschließende Verdau sind erfolgreich verlaufen, da nur im Mutagenese-Ansatz und nicht in der Kontrolle (PCR-Ansatz ohne Zusatz von Polymerase) Plasmid-DNA zu erkennen ist (siehe Abb. 34).

Durch Transformation in *E. coli* XL1-Blue *supercompetent cells* wird die Plasmid-DNA zu einem Ring geschlossen und man hat die Gensequenz des TatA₁₋₄₅F₂₁M im Expressionsvektor pET-28a(+) vorliegen.

Die Bromcyanspaltung spaltet C-terminal von Methionin, wodurch man das TatA_d-Fragment TatA₂₂₋₄₅ erhält (siehe Abb. 35).

22 30 40 45
G P S K L P E I G R A A G R T L L E F K S A T K

Abb. 35 Aminosäuresequenz des TatA₂₂₋₄₅

- **TatA₁₋₂₇**

Dieses Fragment wurde von Dr. Christian Lange (Universität Karlsruhe) [163] dargestellt und spiegelt den transmembranen Bereich des Proteins TatA_d wider.

Als Ausgangsprodukt diente das Plasmid pET-28-TatA₁₋₇₀, welches durch Mutagenese an der Position Glutaminsäure₂₈ in das Stop-Codon TAG überführt wurde (siehe Abb. 36).

| TatA ₁₋₂₇ fwd | GC | T _m | Länge | M |
|---|--------|----------------|-------|------------|
| 5'-CTTCCAAGCTGCCG TAG ATCGGGCGTGCCGC-3' | 67,7 % | 81,1 °C | 31 N | 9489 g/mol |

| TatA ₁₋₂₇ rev | GC | T _m | Länge | M |
|---|--------|----------------|-------|------------|
| 5'-GCGGCACGCCCGAT CTA CGGCAGCTTGGAAG-3' | 67,7 % | 81,1 °C | 31 N | 9547 g/mol |

Abb. 36 **pET-28-TatA₁₋₂₇ Mutagenese Primer**

Rot: eingeführtes Stop-Codon

Bei der Translation wird das Protein nur bis zu diesem Stop-Codon abgelesen und man erhält ein TatA_d-Fragment, welches nur den transmembranen Bereich umfasst. Aufgrund der hohen Hydrophobizität dieses Fragments muss es durchgehend in Detergenz-Mizellen solubilisiert vorliegen, da das Protein nach einer Präzipitation nur sehr schwer wieder in Lösung zu bekommen ist. Somit konnte dieses Proteinfragment nicht mit Hilfe einer Bromcyanspaltung vom N-terminalen His-Tag befreit werden. Es wurde deshalb in detergenzhaltiger Lösung mit Hilfe des Enzyms Trypsin gespalten. Da Trypsin selektiv nach den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet, bleibt noch das Tripeptid GSH am Anfang des Protein-Fragments zurück (siehe Abb. 37).

M G S S H H H H H S S G L V P **R G S H Start**

Abb. 37 **Aminosäuresequenz des His-Tag im Expressionsvektor pET-28a(+)**

Aus diesem Grund wurde noch eine weitere Deletionsmutagenese durchgeführt, um das vektorcodierte Tripeptid GSH zu eliminieren (siehe Abb. 38).

| TatA ₁₋₂₇ -GSH_fwd | GC | Länge | M |
|---------------------------------------|--------|-------|------------|
| 5'-CCTGGTGCCGCGC ATGTTTTCAAACATTGG-3' | 53,3 % | 30 N | 9189 g/mol |

| TatA ₁₋₂₇ -GSH_rev | GC | Länge | M |
|---------------------------------------|--------|-------|--------------|
| 5'-CCAATGTTTGAAAACAT GCGCGGCACCAGG-3' | 53,3 % | 30 N | 9225,1 g/mol |

Abb. 38 **pET-28-TatA₁₋₂₇ Deletions-Mutagenese Primer**

Leerzeichen im Primer zeigt die Stelle der Deletion.

Das Plasmid wurde wieder in *E. coli* XL1-Blue *supercompetent cells* transformiert, wodurch das Plasmid zu einem Ring geschlossen wird und somit die Gensequenz des TatA₁₋₂₇ im Expressionsvektor pET-28a(+) vorliegt.

4.1.2 Biosynthese der TatA_d-Fragmente

Zur Expression wurden Zellen des Stammes *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Dieser Stamm wurde für eine hohe Proteinexpressionsrate optimiert. Er enthält ein IPTG-induzierbares Gen für eine T7-RNA-Polymerase. Diese wird für die Expression eines Gens auf einem Expressionsvektor mit T7-Promotor, wie dem pET-28a(+), benötigt. Für die Expression des sehr hydrophoben Fragmentes TatA₁₋₂₇ wurden hingegen *E. coli* C41(DE3) Zellen, welche speziell auf die Expression von toxischen Membranproteinen optimiert sind [166], verwendet. Die entsprechenden *E. coli* Zellen wurden zu Beginn mit dem Plasmid des entsprechenden TatA_d-Fragments transformiert.

Vor der Expression im präparativen Maßstab wurden Testexpressionen durchgeführt, um den optimalen Induktionszeitpunkt und die optimale Expressionsdauer festzustellen. Der Zeitpunkt der Induktion hatte bei allen TatA_d-Fragmenten kaum Einfluss auf die Proteinausbeute. Die Induktion wurde somit immer im Bereich von OD₆₀₀ = 0,6-1,2 a.u. durchgeführt. Die optimale Expressionsdauer betrug bei dem Fragment TatA₂₂₋₇₀ etwa 4-6 Stunden, da es bei längeren Expressionszeiten wieder abgebaut wurde. Bei allen weiteren Fragmenten wurden hingegen Expressionszeiten von 16-22 Stunden angewendet, um eine möglichst hohe Bakterien- und Proteinausbeute zu ermöglichen (siehe Abb. 42).

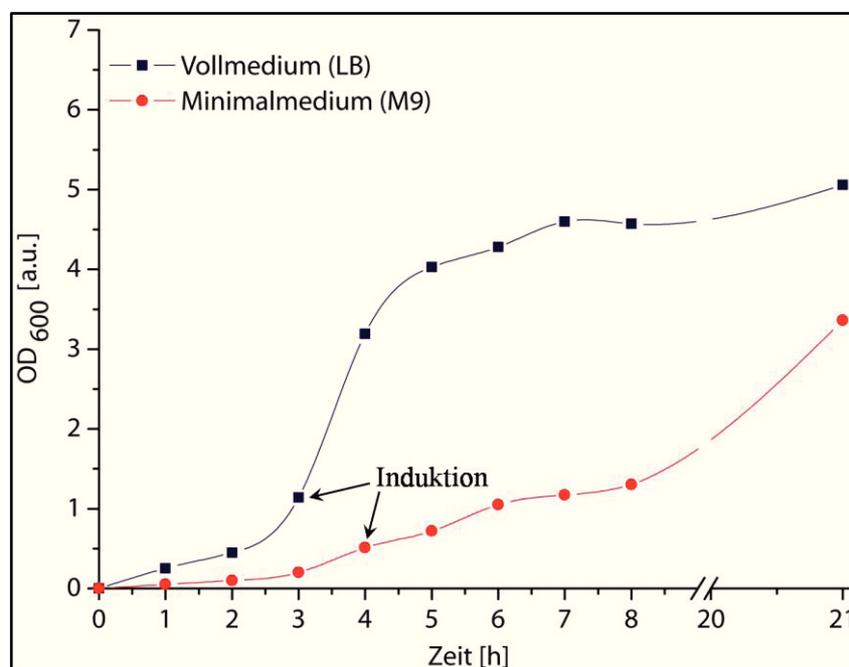


Abb. 42 Wachstumskurve von *E. coli* bei der Expression von TatA₂₋₄₅ in Voll- und Minimalmedium

Für die Expression von unmarkiertem Probenmaterial, welches zum Beispiel für die CD-Untersuchungen benötigt wird, wurde LB-Medium verwendet. Hierbei handelt es sich um ein

Vollmedium, in dem alle Nährstoffe in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, aber keine genaue Definition der Zusammensetzung möglich ist. Anhand der gezeigten Wachstumskurve erkennt man, dass in diesem Medium die Bakterien schneller wachsen und auch die Ausbeute nach 21 Stunden Expressionszeit höher ist.

Für die NMR-Untersuchungen wird jedoch mit NMR-aktiven Kernen markiertes Probenmaterial benötigt, wozu die TatA_d-Fragmente mit den Isotopen ¹⁵N beziehungsweise ¹³C markiert wurden. Hierbei verwendet man ein Minimalmedium, welches eine genaue Definition der Zusammensetzung erlaubt. Für das Einführen einer uniformen ¹⁵N- bzw. ¹³C-Isotopenmarkierung wurde ein M9-Medium verwendet, wobei als einzige Stickstoffquelle ¹⁵N-markiertes Ammoniumchlorid beziehungsweise als einzige Kohlenstoffquelle ¹³C-markierte Glucose bei der Expression vorlag. Sollen hingegen einzelne Aminosäuren selektiv markiert werden, enthält das Expressionsmedium als Stickstoffquelle unmarkiertes Ammoniumchlorid. Kurz vor der Induktion wird dann die entsprechende ¹⁵N-markierte Aminosäure zusammen mit allen weiteren proteinogenen Aminosäuren (unmarkiert) dem Expressionsmedium zugesetzt. Die Bakterien verwenden daraufhin bevorzugt die im Medium vorliegenden Aminosäuren für die Proteinbiosynthese. Aufgrund von *Scrambling* wurde die Expressionsdauer auf vier Stunden verkürzt. Mit *Scrambling* bezeichnet man den, durch den Aminosäure-Stoffwechsel hervorgerufenen, Austausch der Markierung in andere Aminosäuren.

Das Ergebnis der jeweiligen Expression wurde nach der Zellernte durch eine SDS-PAGE überprüft (siehe Abb. 43)

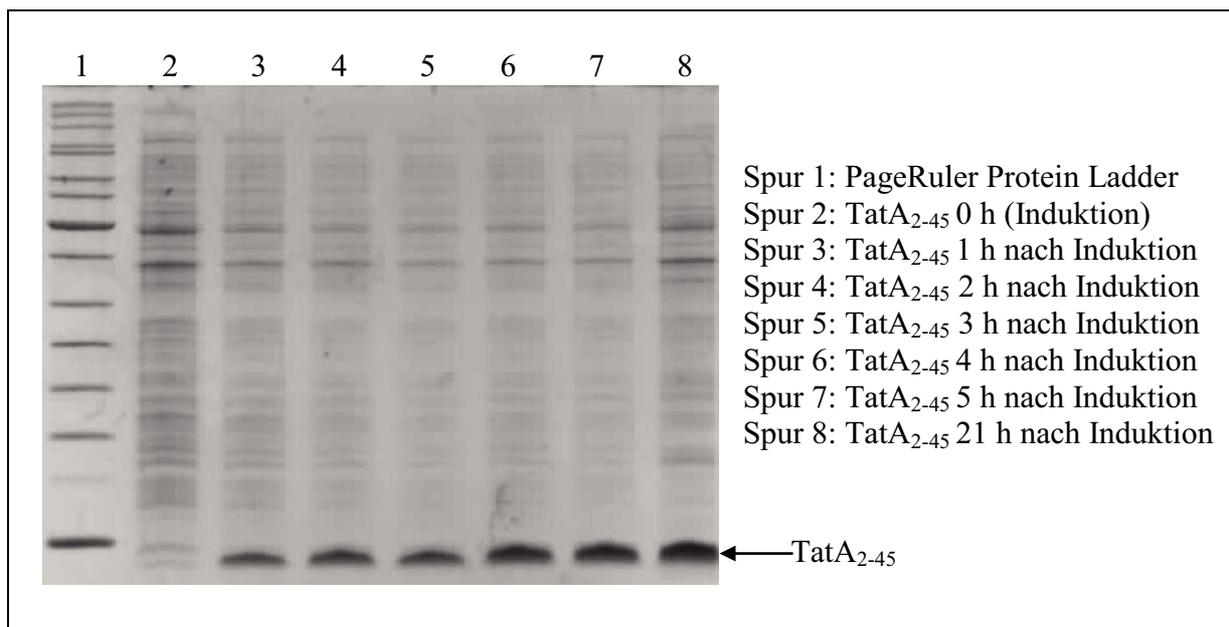


Abb. 43 SDS-PAGE einer Expression des TatA₂₋₄₅ in Vollmedium [165]

Die Abbildung zeigt als Beispiel die SDS-PAGE einer Expression von TatA₂₋₄₅ in Vollmedium (LB). Es ist deutlich zu erkennen, wie die Menge des exprimierten Proteins mit der Expressionsdauer zunimmt und auch nach einer langen Expressionsdauer von 21 Stunden das Protein nicht wieder abgebaut wird.

4.1.3 Aufreinigung der TatA_d-Fragmente

Die Zellen wurden nach der Expression durch Zentrifugation geerntet und nach der Zugabe von Proteaseinhibitoren mit Ultraschall oder mittels French Press aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation und die Membranen mittels Ultrazentrifugation abgetrennt. Der Überstand der Ultrazentrifugation entspricht der Zellplasma-Fraktion, welche alle löslichen Proteine enthält. Die Zelltrümmer-Fraktion, die aus Zelltrümmern, eventuell gebildeten *inclusion bodies* und unaufgeschlossenen Zellen besteht, wurde ebenso wie die Membran-Fraktion mit Hilfe des anionischen Detergenzes NLS (N-lauroylsarcosine) solubilisiert. Es ergeben sich somit drei Fraktionen, die je nach Fragment eine unterschiedliche Menge an Protein beinhalten (siehe Abb. 44).

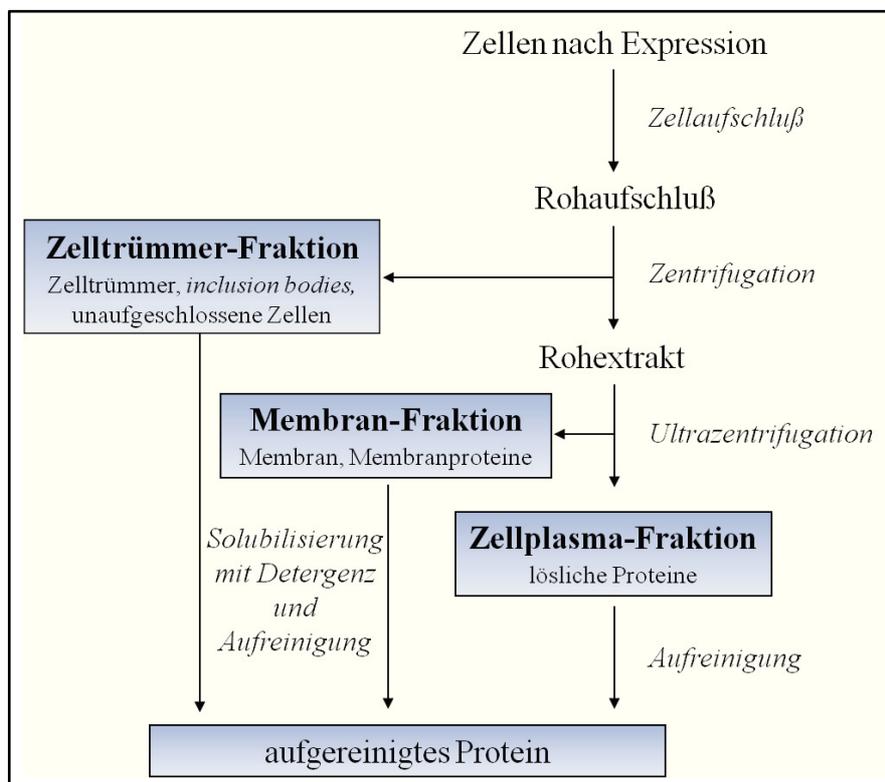


Abb. 44 Überblick Proteinaufreinigung

Die weitere Aufreinigung unterscheidet sich je nach Fragment, weshalb hier für jedes Fragment die weiteren Aufreinigungsschritte kurz skizziert werden.

- **TatA₂₋₄₅**

Zu Beginn der Aufreinigung wurde eine Lokalisation des Proteins mittels SDS-PAGE durchgeführt (siehe Abb. 45).

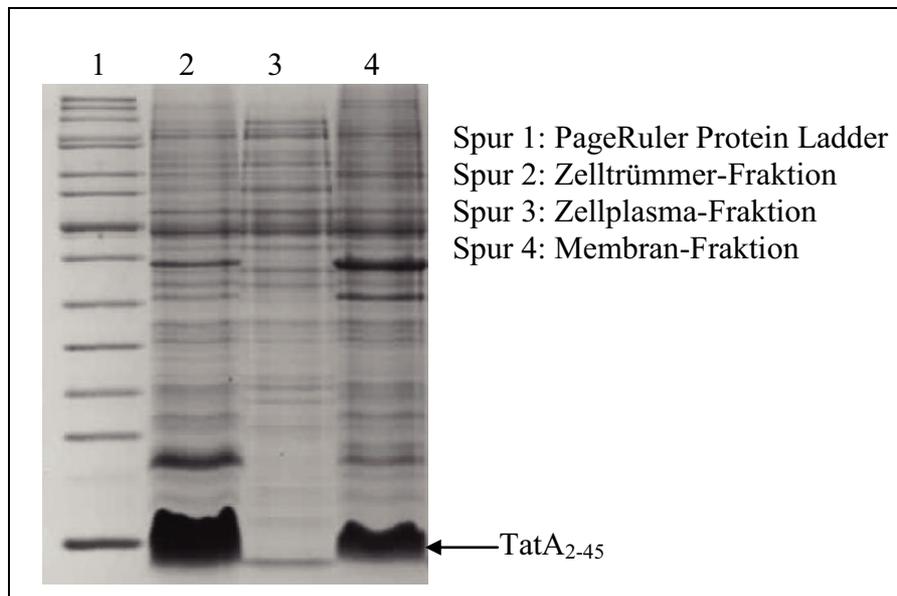


Abb. 45 **Lokalisation des TatA₂₋₄₅** [165]

Die SDS-PAGE von Proben der einzelnen Fraktionen zeigt, dass sich TatA₂₋₄₅ hauptsächlich in der Membran- und Zelltrümmer-Fraktion befindet. Im Gegensatz zu TatA₂₋₇₀ befindet sich kaum Protein im Zellplasma. Durch Abtrennen des unstrukturierten C-Terminus ist also die Löslichkeit des Proteins verloren gegangen, oder nur das ungekürzte Protein ist in der Lage mizellenartige Strukturen auszubilden, wie sie für im Cytosol gelöstes TatA_d beobachtet werden konnten [75].

Das Protein muss nun aus der Membran- und Zelltrümmer-Fraktion herausgelöst werden. Hierzu wurden die jeweiligen Fraktionen mit dem Detergenz NLS solubilisiert.

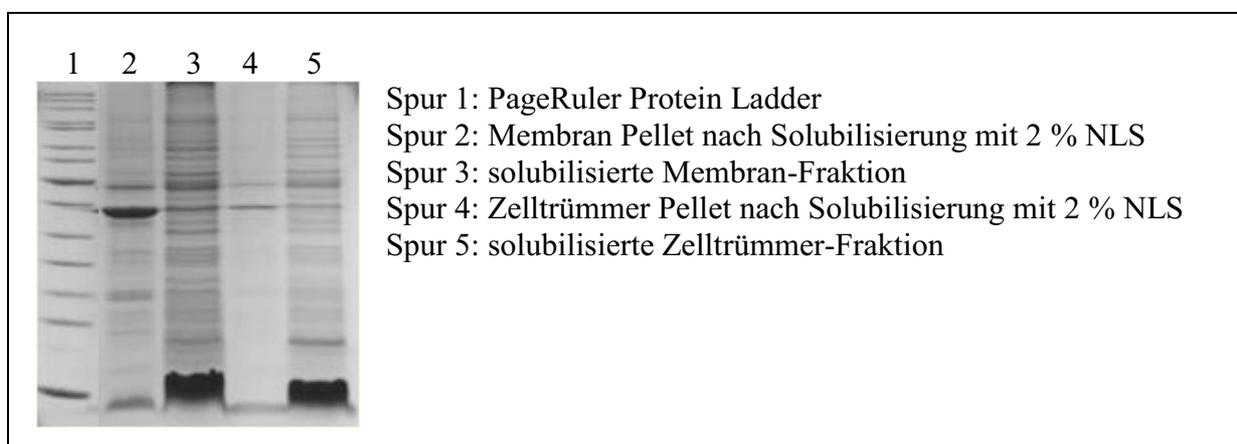


Abb. 46 **SDS-PAGE der Solubilisierung von TatA₂₋₄₅** [165]

Anhand der SDS-PAGE erkennt man deutlich, wie effektiv das Detergenz NLS das Protein aus dem Pellet der Zelltrümmer- und Membran-Fraktion herauslöst. Nach Behandlung der jeweiligen Fraktion mit einem NLS-haltigen Puffer (2%) konnte nahezu das komplette Protein solubilisiert werden (siehe Abb. 46).

Mit Hilfe einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde das Protein anschließend aus beiden Fraktionen isoliert.

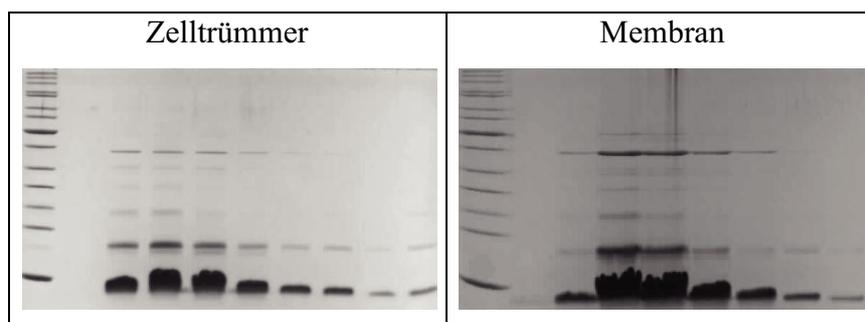


Abb. 47 **Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie [165]**

Man erkennt in der SDS-PAGE der Elutionsfraktionen deutlich die Banden von TatA₂₋₄₅ (siehe Abb. 47). Besonders auffallend sind die in symmetrischen Abständen auftauchenden weiteren Banden. Diese könnten durch Oligomere von TatA₂₋₄₅ hervorgerufen werden. Diese Oligomere treten aber nur beim ungespaltenem Protein auf, so dass es sich hier wahrscheinlich um eine durch den His-Tag hervorgerufene Oligomerisierung handelt [165].

Anschließend wurde das Protein bei 4 °C dialysiert, wobei es präzipitiert. Für die Bromcyanspaltung, wobei der His-Tag zusammen mit Methionin₁ abgespalten wird, wurde es wieder in 50 % TFA aufgenommen. Zur Entfernung der Spaltungsreagenzien wurde das Protein lyophilisiert und anschließend wieder mit NLS-haltigem Puffer solubilisiert. Zur Abtrennung von ungespaltenem Protein und abgespaltenem His-Tag wurde eine subtraktive Ni-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt.

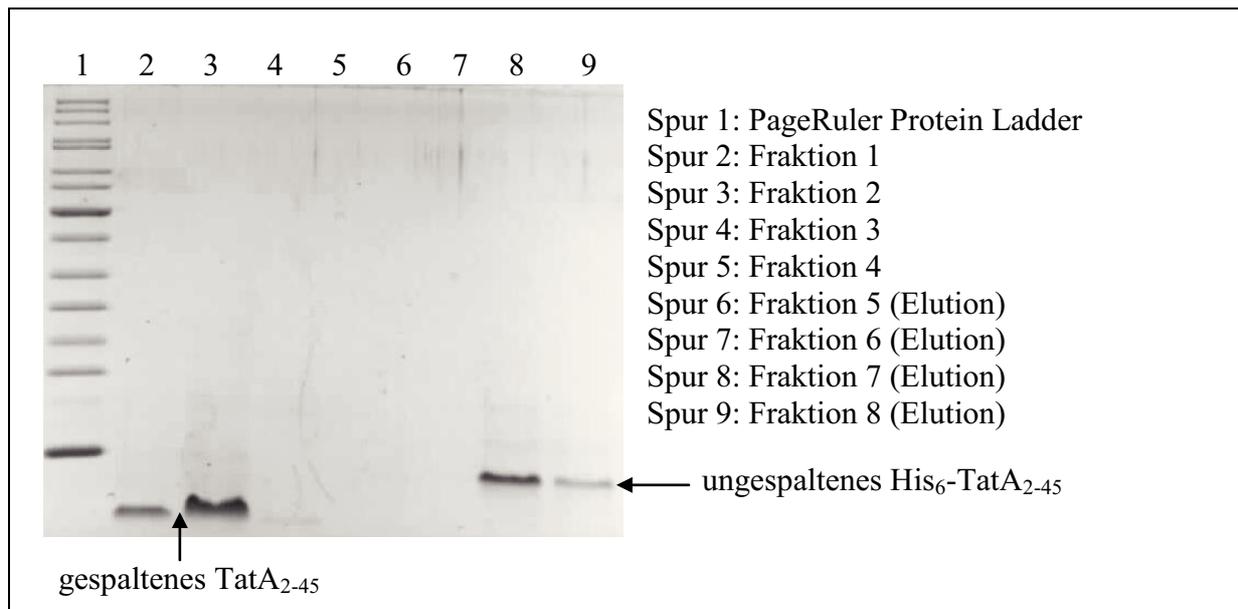


Abb. 48 SDS-PAGE einer subtraktiven Ni-NTA-Affinitätschromatographie [165]

Die SDS-PAGE der subtraktiven Ni-NTA-Affinitätschromatographie zeigt deutlich, dass das gespaltene TatA₂₋₄₅ nicht mehr an die Säule bindet und sich somit im Durchfluss befindet, wohingegen das ungespaltene Protein erst mit Hilfe des Elutionspuffers von der Säule gewaschen wird (siehe Abb. 48).

Das Protein wurde anschließend wieder bei 4 °C dialysiert, wobei es präzipitiert, und abschließend lyophilisiert, wodurch man TatA₂₋₄₅ als weißes Pulver in einer Ausbeute von ca. 30 mg pro Liter Expressionsmedium erhält [163, 165].

- **TatA₂₂₋₄₅**

Da dieses Fragment aus dem Protein TatA₂₋₄₅F₂₁M gebildet wird, ist seine Aufreinigung bis zur Bromcyanspaltung identisch zu TatA₂₋₄₅.

Bei der Bromcyanspaltung wird dann das lösliche Fragment TatA₂₂₋₄₅ freigesetzt. Um möglichst nur dieses Fragment aus dem Spaltungsrückstand nach der Lyophilisation herauszulösen, wurde dieser mit einem Puffer mit einer nur geringen NLS-Konzentration (0,1 %) aufgenommen. Um das Protein von dem ebenfalls leicht löslichen His-Tag abzutrennen, wurde wieder eine subtraktive Ni-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Nach einer Dialyse zur Salzentfernung folgte eine Lyophilisation, wobei man TatA₂₂₋₄₅ als weißes Pulver in einer Ausbeute von ca. 15 mg pro Liter Expressionsmedium erhält [163, 165].

- **TatA₂₋₇₀**

Der Großteil von TatA₂₋₇₀ befindet sich sowohl in der Zellplasma-Fraktion als auch in der Membran-Fraktion. Dies zeigt, dass TatA_d, zumindest als rekombinantes Protein mit His-Tag, auch als lösliches Protein in der Zelle vorliegen kann und somit kein ausschließlich integrales Membranprotein darstellt.

Die Aufreinigung erfolgt analog zu TatA₂₋₄₅, wobei in diesem Fall neben der Membran-Fraktion auch noch die Zellplasma-Fraktion aufgearbeitet wird. Die Ausbeute an aufgereinigtem Protein beträgt ca. 30 mg pro Liter Expressionsmedium [163].

- **TatA₁₋₂₇**

Dieses Fragment besteht nur aus dem hydrophoben Teil des Proteins und befindet sich somit ausschließlich in der Membran-Fraktion.

Zu Beginn wurde das Protein wie bei allen anderen Fragmenten mit Hilfe einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert. Das Produkt kann jedoch keiner Bromcyanspaltung unterzogen werden, da der Rückstand nach der Lyophilisation aufgrund der hohen Hydrophobizität unlöslich bleibt. Das Protein wurde also durchgehend in einem NLS-haltigem Puffer gehalten und mit TPCK-behandeltem Trypsin gespalten, wobei der Fortgang der Spaltung per SDS-PAGE überprüft wurde. Nach Abschluss des Verdaus wurden Proteaseinhibitoren zugesetzt, und es folgte eine abschließende Aufreinigung mittels Gelfiltrationschromatographie. TatA₁₋₂₇ kann aufgrund seiner Hydrophobizität nicht dialysiert oder lyophilisiert werden und muss durchgehend in NLS-haltigem Puffer bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Ausbeute dieses Fragments beträgt ca. 3-4 mg pro Liter Expressionsmedium [163].

- **TatA₂₂₋₇₀**

Dieses lösliche Fragment liegt ausschließlich in der Zellplasma-Fraktion vor und somit konnte die Aufreinigung komplett ohne Zugabe von Detergenzien erfolgen. Zu Beginn wurde wieder eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie zur Isolierung des Fragments durchgeführt. Nach der Entfernung des His-Tags mittels Bromcyanspaltung folgte eine subtraktive Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Anschließend wurde eine Entsalzung mittels Gelfiltrationschromatographie durchgeführt, und Lyophilisation ergab TatA₂₂₋₇₀ als weißes Pulver in einer Ausbeute von ca. 20 mg pro Liter Expressionsmedium [163].

4.1.4 Charakterisierung der TatA_d-Fragmente

Die TatA_d-Fragmente wurden nach der Aufreinigung mittels MALDI-Massenspektrometrie und SDS-PAGE charakterisiert und auf Reinheit überprüft. Abb. 49 zeigt die erwarteten Massen der jeweiligen dargestellten Konstrukte.

| Fragment | TatA ₂₋₇₀ | TatA ₂₋₄₅ | TatA ₂₂₋₄₅ | TatA ₂₂₋₇₀ | TatA ₁₋₂₇ |
|--|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| unmarkiert | 7299,5 Da | 4683,6 Da | 2527,9 Da | 5143,7 Da | 2884,6 |
| uniform ¹⁵ N-markiert | 7384,5 Da | 4737,6 Da | 2560,9 Da | 5207,7 Da | - |
| uniform ¹⁵ N- und ¹³ C-markiert | 7716,5 Da | 4960,6 Da | - | - | - |

Abb. 49 Massen der TatA_d-Konstrukte

Die Massen wurden mit Hilfe des Programms peptidemass [167, 168] berechnet.

Bei den angegebenen Massen handelt es sich um die *average mass*.

4.2 Zirkulardichroismus (CD) Messungen an den TatA_d-Fragmenten

Die ersten an den TatA_d-Fragmenten durchgeführten Strukturuntersuchungen waren Zirkulardichroismus (CD) Messungen. Es sollte damit die Sekundärstruktur der einzelnen Fragmente untersucht werden, bevor mit Hilfe von orientiertem Zirkulardichroismus (OCD) die Orientierung in der Membran bestimmt wird.

Die CD-Spektroskopie liefert nur globale Informationen, das heißt, dass keine Aussage über die Sekundärstruktur der einzelnen Bereiche eines Proteins getroffen werden kann. Das resultierende CD-Spektrum ist somit eine Überlagerung aller im Protein vorkommenden Sekundärstrukturelemente. Mit Hilfe des verwendeten reduktionistischen Ansatzes war es dennoch möglich die Sekundärstruktur der einzelnen Bereiche des Proteins TatA_d und deren Orientierung in der Membran abzuschätzen.

4.2.1 CD-Spektroskopie an TatA_d-Fragmenten in Lipid-Vesikeln

Die Proteine sollten in einer Membran-imitierenden Umgebung untersucht werden, weshalb die CD-Spektren in Lipid-Vesikeln aufgenommen wurden. In früheren Untersuchungen an dem Fragment TatA₂₂₋₇₀ von Dr. Sonja Müller (Universität Karlsruhe) zeigte sich, dass dieses Fragment nur in negativ geladenen Umgebungen (SDS-Mizellen, Phospholipid-Vesikel mit einem hohen Gehalt an DMPG) gefaltet, hingegen in neutralen Umgebungen (DPC-Mizellen, DMPC-Vesikel) unstrukturiert vorliegt [156, 163]. Auch wenn sich herausstellte, dass nicht alle Fragmente eine negative Ladung zur Faltung benötigen (insbesondere Fragmente, die den Transmembranteil beinhalten wie TatA₂₋₄₅), wurden alle Konstrukte in DMPC/DMPG-Vesikeln (30:70) in einem Protein/Lipid-Verhältnis von 1:100 rekonstituiert. Dies ist auch aus einem weiteren Grund bedeutsam, da bereits gezeigt wurde, dass die negative Ladung der Phospholipide in der Bakterienmembran eine bedeutende Rolle für den Tat-abhängigen Transport spielt [169]. Somit stellen die verwendeten, negativ geladenen DMPC/DMPG-Vesikel (30:70) ein gutes Modellmembransystem dar.

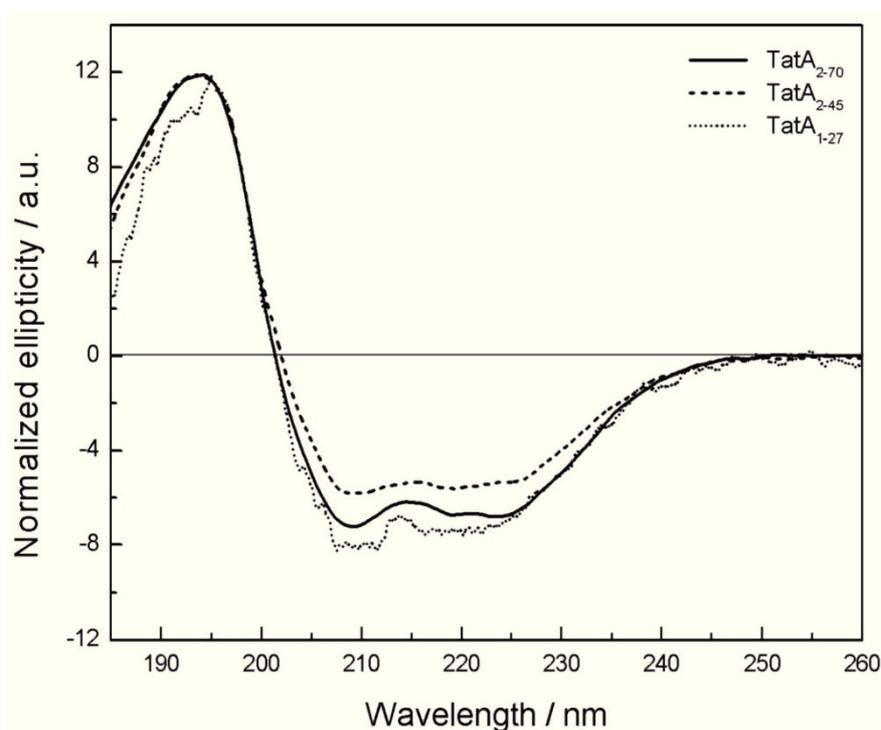


Abb. 50 **CD-Spektren der TatA-Fragmente mit Transmembranteil [163]**

DMPC/DMPG-Vesikel (30:70); P:L = 1:100; 30 °C

Die Spektren wurden auf die gleiche Intensität der positiven Bande normiert.

Generell können CD-Spektren qualitativ anhand des spektralen Musters oder auch quantitativ mittels entsprechender Auswertalgorithmen mit den CD-Basispektren für die reinen Sekundärkonformationen von Proteinen verglichen werden. Diese Basispektren (vergleiche Abb. 9) sind bekannt und wurden anhand mathematischer Algorithmen aus den CD-Spektren von Referenzproteinen mit bekanntem Gehalt an Sekundärstrukturelementen errechnet.

Eine quantitative Auswertung der CD-Spektren der TatA_d-Fragmente war leider nicht möglich, da keine MRE-Werte (*Mean Residue Ellipticity*) berechnet werden konnten. Der MRE-Wert stellt eine mittlere molare Elliptizität pro Peptidbindung dar und erlaubt somit einen Vergleich von Spektren verschiedener Proben. Zur Berechnung der MRE-Werte wird die genaue Proteinkonzentration benötigt, wie anhand der folgenden Formel ersichtlich ist.

$$[\theta]_{MRE} = \frac{\theta}{10 \cdot c_r \cdot d} \quad [\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimol}^{-1}]$$

$$c_r = \frac{n \cdot c_g}{M_w} \quad [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$$

θ = Elliptizität [mdeg]; M_w = Molekulargewicht des Proteins [g/mol]

n = Anzahl der Peptidbindungen; c_g = Proteinkonzentration [g/l]; d = Schichtdicke [cm]

Da die TatA-Fragmente aber kein Tryptophan enthalten, ist eine spektroskopische Proteinmengenbestimmung nicht möglich, und eine colorimetrische Bestimmung bzw. eine Berechnung aufgrund der Einwaage ist aufgrund der großen Fehlerquellen zu ungenau.

Um einen qualitativen Vergleich durchführen zu können wurden die Spektren auf die gleiche Intensität der positiven Bande normiert. Alle Spektren zeigen eine starke positive Bande bei 190 nm und zwei negative Banden bei 203 nm und 222 nm (siehe Abb. 50). Der qualitative Vergleich mit den Basisspektren zeigt recht deutlich, dass alle hier aufgeführten Konstrukte einen hohen α -helikalen Anteil aufweisen. Die leichte Verschiebung des Minimums bei 208 nm zu kleineren Wellenlängen, welche bei TatA_{22-70} beobachtet werden kann, lässt auf einen etwas höheren unstrukturierten Anteil schließen.

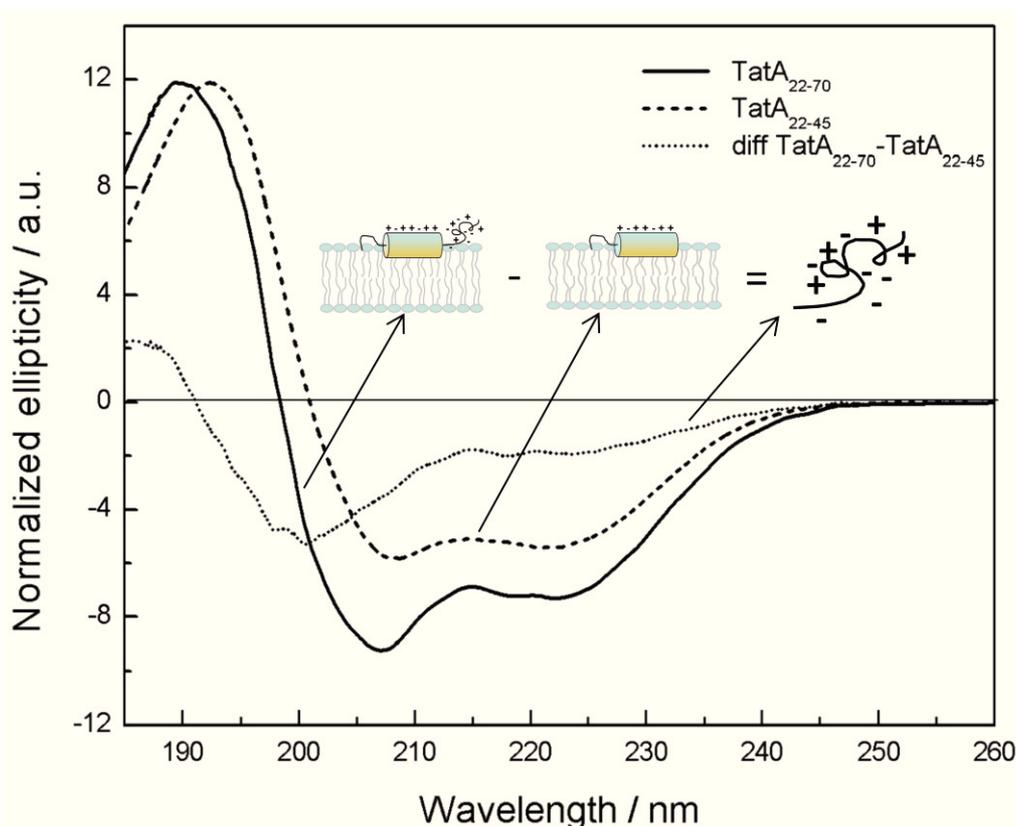


Abb. 51 **CD-Spektren der TatA_d-Fragmente TatA₂₂₋₄₅ und TatA₂₂₋₇₀** [163]

DMPC/DMPG-Vesikel (30:70); P:L = 1:100; 30 °C

Die Spektren wurden auf die gleiche Intensität der positiven Bande normiert.

Die CD-Spektren der beiden amphiphilen Fragmente TatA_{22-45} und TatA_{22-70} weisen ebenfalls einen hohen α -helikalen Anteil auf (siehe Abb. 51). Das Minimum bei 208 nm im Spektrum von TatA_{22-70} ist jedoch deutlich in den kürzerwelligen Bereich verschoben. Dies lässt auf einen unstrukturierten Anteil im Proteinfragment TatA_{22-70} schließen. Wenn man ein Differenzspektrum von den Fragmenten TatA_{22-70} und TatA_{22-45} berechnet, erhält man als resultierendes Spektrum ein typisches Spektrum für eine ungeordnete Peptidstruktur mit

einem ausgeprägten Minimum bei 200 nm. Da sich die beiden Fragmente nur um die Aminosäuren 46 bis 70 unterscheiden, konnte somit zum ersten Mal direkt gezeigt werden, dass der C-Terminus von TatA_d unstrukturiert ist.

4.2.2 OCD-Spektroskopie von TatA_d-Fragmenten in orientierten Lipiddoppelschichten

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie konnte bisher gezeigt werden, dass alle Fragmente gefaltet sind und einen hohen α -helikalen Anteil besitzen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der C-Terminus von TatA_d wirklich unstrukturiert ist. Es konnte jedoch noch keine Aussage über die Orientierung der einzelnen Proteinsegmente in der Membran getroffen werden. Diese Fragestellung sollte mit Hilfe der orientierten Zirkulardichroismus-Spektroskopie (OCD) geklärt werden. Hierbei wird das Protein in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituiert und das CD-Signal gemessen. Die OCD-Spektroskopie eignet sich sehr gut um die Lage einer α -Helix bezüglich einer Membran zu bestimmen. Obwohl wieder nur globale Informationen über das untersuchte Protein zu erlangen sind, sollte es durch den Vergleich der verschiedenen Fragmente trotzdem möglich sein die Lage der einzelnen Proteinsegmente bezüglich der Membran zu bestimmen. Als Modellmembran diente wiederum eine Mischung aus DMPC/DMPG (70/30), wie sie auch schon bei der CD-Spektroskopie in Lipidvesikeln Anwendung fand. Auch das Protein/Lipid-Verhältnis betrug ebenfalls wieder 1:100 (TatA₂₂₋₄₅: 1:50).

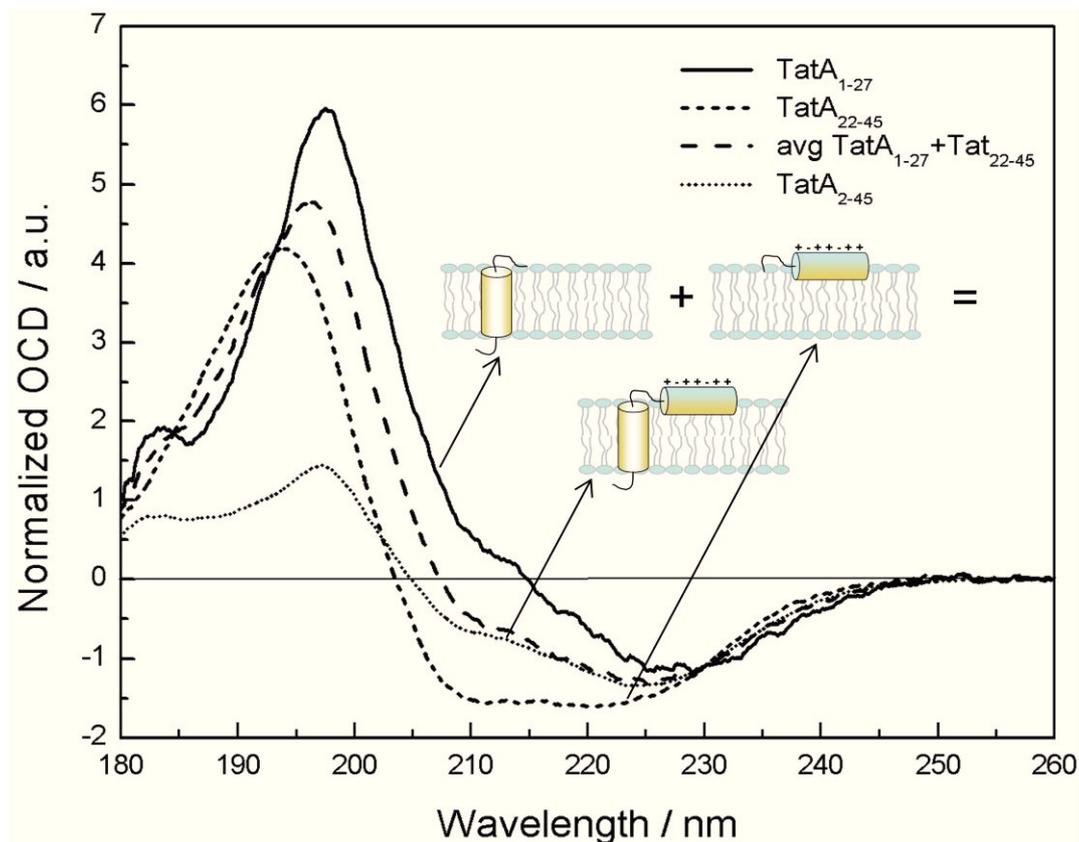


Abb. 52 **OCD-Spektren von TatA₁₋₂₇, TatA₂₂₋₄₅ und TatA₂₋₄₅ [163]**
 DMPC/DMPG-Lipiddoppelschichten (30:70); P:L = 1:100 (TatA₂₂₋₄₅: 1:50); 97 % rH; 30 °C
 Die Spektren wurden auf die gleiche Intensität bei 230 nm normiert.

Es konnten wieder keine MRE-Werte angegeben werden, da die Proteinkonzentration nicht genau bestimmt werden konnte. Aus diesem Grund wurden die Spektren auf die gleiche Intensität bei 230 nm normiert, damit ein qualitativer Vergleich möglich wird. Die aussagekräftigste Region des Spektrums ist bei 208 nm. Ist in diesem Bereich eine ausgeprägte negative Bande zu erkennen, so liegt die Helix parallel auf der Membranoberfläche. Das OCD-Spektrum von TatA₁₋₂₇ zeigt keine Bande bei 208 nm, was auf eine transmembrane Orientierung dieses Fragments schließen lässt. TatA₂₂₋₄₅ hingegen zeigt eine sehr ausgeprägte Bande in diesem Bereich, woraus man schließen kann, dass es sich um eine amphiphile Helix handelt, die flach auf der Membran aufliegt. Für das Fragment TatA₂₋₄₅, welches aus einer transmembranen Helix und einer amphiphilen Helix bestehen soll, würde man ein intermediäres Spektrum erwarten. Das Spektrum von TatA₂₋₄₅ zeigt tatsächlich eine schwächer ausgeprägte Bande bei 208 nm, was auf eine Mischung beider Anteile oder einen geneigten Zustand hindeutet (Abb. 52). Außerdem entspricht es sehr gut dem arithmetischen Mittel der beiden Fragmente TatA₁₋₂₇ und TatA₂₂₋₄₅. Man kann daraus schließen, dass zum einen dieses Fragment eine Mischung aus transmembranem Segment und

amphiphilem Segment enthält und zum anderen, dass die einzelnen Fragmente zumindest qualitativ die gleiche Orientierung wie im kombinierten Konstrukt TatA₂₋₄₅ einnehmen.

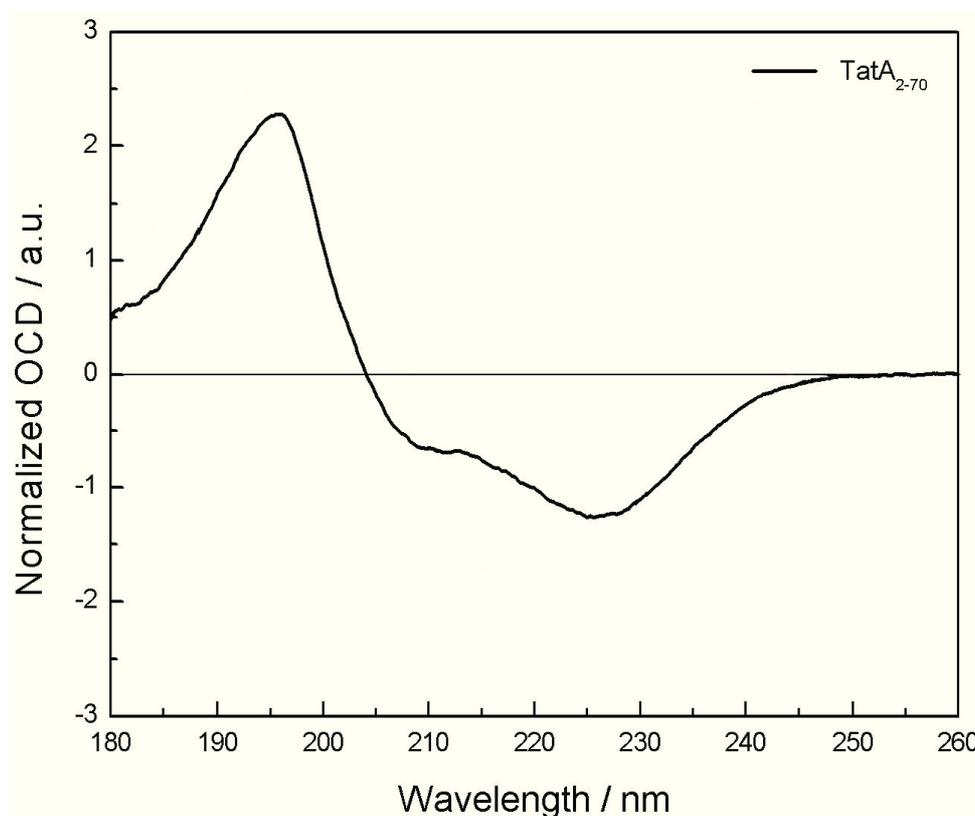


Abb. 53 **OCD-Spektrum von TatA₂₋₇₀**
DMPC/DMPG-Lipiddoppelschichten (30:70); P:L = 1:100; 97 % rH; 30 °C

Das Spektrum von TatA₂₋₇₀ (Abb. 53) zeigt große Ähnlichkeit zum OCD-Spektrum von TatA₂₋₄₅. Die Bande bei 208 nm ist wieder nur leicht ausgeprägt, was auf eine Mischung von transmembraner und flach auf der Membran aufliegender Orientierung hindeutet. Die positive Bande des Spektrums ist jedoch im Vergleich zu TatA₂₋₄₅ leicht in den kürzerwelligen Bereich verschoben, was ein Hinweis auf einen unstrukturierten Anteil darstellt. Da sich die Konstrukte TatA₂₋₄₅ und TatA₂₋₇₀ nur um den unstrukturierten C-Terminus unterscheiden, entspricht auch dieses Spektrum dem vorhergesagten Strukturmodell.

Durch die OCD-Messungen konnte das vorhergesagte Strukturmodell von TatA_d [51, 164], mit einer N-terminalen transmembranen α -Helix gefolgt von einer amphiphilen α -Helix und einem unstrukturierten C-Terminus, zum ersten Mal experimentell bestätigt werden.

4.3 Festkörper-NMR Messungen an TatA_d-Fragmenten

Da die CD-Ergebnisse nur globale Informationen liefern und somit keine genaue Bestimmung z.B. der Neigung der α -Helix in der Membran zulassen, wurden NMR-spektroskopische Messungen herangezogen, um das erste Strukturmodell von TatA_d weiter zu verfeinern.

Festkörper-NMR Spektren enthalten durch anisotrope Wechselwirkungen mehr Informationen als die entsprechenden Flüssigkeits-NMR Spektren. Diese Wechselwirkungen sind in der Flüssigkeits-NMR durch die schnelle Bewegung der Moleküle (Brown'sche Molekularbewegung) ausgemittelt und führen somit zu schmalen Linien. Um aus den, durch die anisotropen Wechselwirkungen stark überlappenden und verbreiterten Linien in einem Festkörper-NMR Spektrum trotzdem die gewünschten Informationen zu erhalten, werden die Spektren durch unterschiedliche Methoden vereinfacht. Zum einen können beispielsweise Isotopen-markierte Proben und zum anderen können orientierte Proben verwendet werden, um die Anzahl der Signale bzw. die Linienbreite zu verringern [170]. Daneben können auch andere Festkörper-NMR Techniken wie das *Magic Angle Spinning (MAS)* zum Vereinfachen von Spektren unorientierter Proben angewendet werden [171]. Diese erlauben jedoch im Gegensatz zur Messung an orientierten Proben in Membranen keine Bestimmung der Orientierung des Proteins [172].

4.3.1 Rekonstitution des Proteins in Modellmembransystemen

Um orientierte Proben zu erhalten muss das Protein in einem geeigneten Modellmembransystem rekonstituiert werden. Die klassische Methode stellt hierbei die Rekonstitution in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen dar [173]. Das Protein wird entweder mit dem Lipid in organischem Lösungsmittel kosolubilisiert oder in Lipid-Vesikeln über *Bio-Beads* (zur Detergenz-Entfernung) rekonstituiert und anschließend auf Glasplättchen aufgetragen. Beim Trocknen bildet sich ein Lipidfilm auf den Glasplättchen, welcher später in einer definierten Luftfeuchtigkeit rehydratisiert wird, wobei sich spontan die orientierten Lipiddoppelschichten ausbilden. Um eine größere Probenmenge in die NMR-Spule einbringen zu können werden die Glasplättchen gestapelt, und um ein Austrocknen zu vermeiden werden sie in einen Glascontainer mit Wasserreservoir überführt. Das folgende ³¹P-NMR-Spektrum zeigt eine mechanisch orientierte Lipiddoppelschicht auf Glasplättchen. Man erkennt, dass die Probe sehr gut orientiert ist, da nur ein schmales Signal zu erkennen ist, welches durch die parallel zum Magnetfeld stehenden ausgemittelten

^{31}P -CSA-Tensoren der Phospholipide hervorgerufen werden (0° -Orientierung). Das Foto in Abb. 54 zeigt den Aufbau einer solchen Probe im Glascontainer.

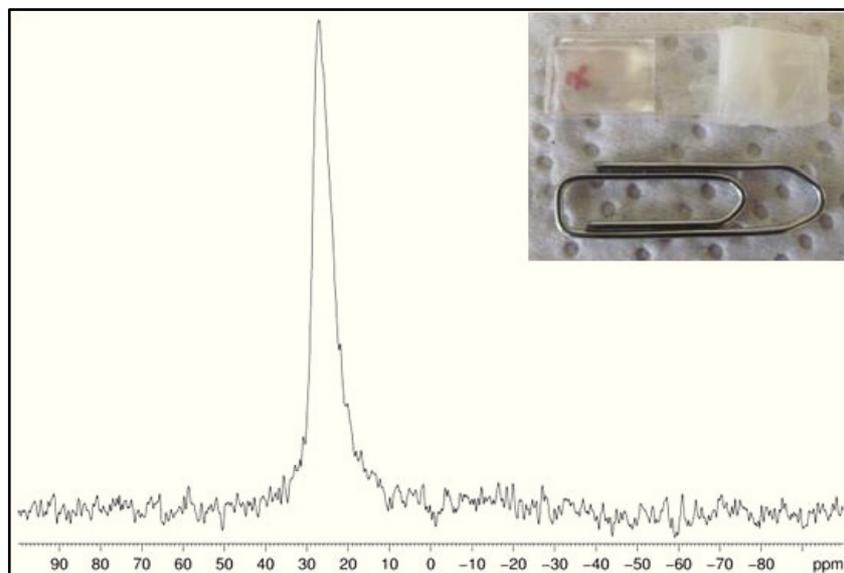


Abb. 54 **Mechanisch orientierte Lipiddoppelschicht auf Glasplättchen**

^{31}P -NMR-Spektrum einer mechanisch orientierten Lipiddoppelschicht (DMPC/DMPG 80:20) auf Glasplättchen
Foto: Bild einer Glasplättchen-Probe im Glascontainer.

Für in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituierte Proteine besteht jedoch immer die Gefahr der Austrocknung der Probe während der Messung. Außerdem ist die Probenhomogenität und der Füllfaktor durch die Glasplättchen eingeschränkt [173].

In letzter Zeit haben sich deshalb orientierte Bizellen als neues Modellmembransystem in der Festkörper-NMR Spektroskopie für Membranproteine immer weiter durchgesetzt (siehe Abb. 55). Bizellen sind eine Mischung aus kurz- und langkettigen Lipiden, welche zur Ausbildung von kreisförmigen Membransegmenten führen und sich im Magnetfeld mit ihrer Membrannormalen senkrecht zu diesem ausrichten [174, 175].

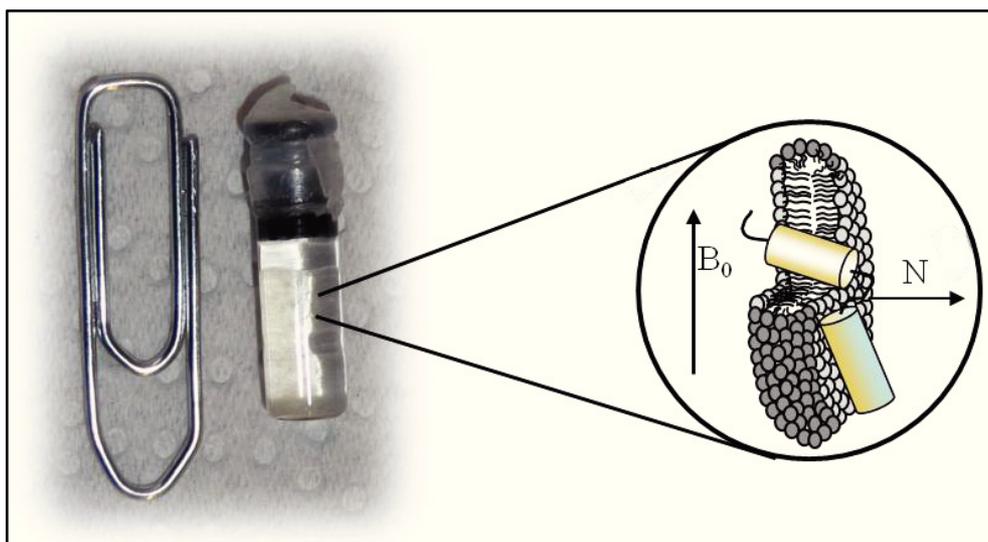


Abb. 55 **Magentisch orientierbare Bizellen**

Bizellen Probe in einem NMR-Probenröhrchen mit einer Büroklammer zum Größenvergleich.

Eine Vielzahl von Parametern haben Einfluss auf die Orientierung von Bizellen im Magnetfeld. So beeinflusst das Verhältnis q , welches das Molverhältnis aus lang- zu kurzkettigen Lipiden darstellt, sowohl die Form als auch den Grad der Orientierung. Mit zunehmenden Verhältnis q werden die Bizellen immer größer und richten sich stärker im Magnetfeld aus. Wohingegen Bizellen mit $q < 1$ auch als isotrope Bizellen bezeichnet werden und Anwendung in der Flüssigkeits-NMR Spektroskopie finden. Auch der Wassergehalt der Bizellen-Mischung, spielt ebenso wie der pH-Wert eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Bizellen [176-179]. Ein ebenso wichtiger Punkt stellt die Wahl der Lipidkomponenten dar. Hier wurden ursprünglich nur zwitterionische Lipide wie DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) verwendet. Viele Membranproteine benötigen jedoch zur Faltung eine negative Ladung, wodurch „saure Bizellen“ mit negativ geladenen Lipiden wie DMPG [1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)] aufkamen. Der Gehalt an DMPG ist jedoch auf ca. 25 % begrenzt, und es können somit keine Bizellen aus ausschließlich negativ geladenem Lipid hergestellt werden [180]. Aus diesem Grund wurde der DMPG-Gehalt in den folgenden Festkörper-NMR Spektren im Gegensatz zur CD-Spektroskopie auf 20 % verringert. Neben der Ladung kann natürlich auch die Dicke der Membran durch die Wahl geeigneter Lipide beeinflusst werden [181, 182].

Um eine bessere Hydrolysebeständigkeit zu erzielen, welche besonders bei nicht neutralen pH-Werten wichtig ist, wurden etherverknüpfte Lipide eingesetzt. So stellt 6-O-PC (1,2-di-O-hexyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) ein etherverknüpftes Analogon für das kurzkettige Lipid DHPC (1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) dar und 14-O-PC (1,2-di-O-tetradecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) ist das entsprechende Analogon für das langkettige Lipid

DMPC [183]. Da die etherverknüpften Lipide aber einen sehr viel höheren Anschaffungspreis besitzen, wurde für die folgenden Messungen nur das hydrolyseanfälligeres, kurzkettige Lipid DHPC durch sein etherverknüpftes Analogon ersetzt.

Auch die Temperatur hat einen wichtigen Einfluss auf die Bizellen-Bildung. Bei tiefen Temperaturen liegen gemischte Mizellen vor, ab einer Übergangstemperatur, die für die jeweilige Bizellen-Mischung charakteristisch ist, bilden sich die Bizellen aus, und die Lösung wird hochviskos [176, 177, 179].

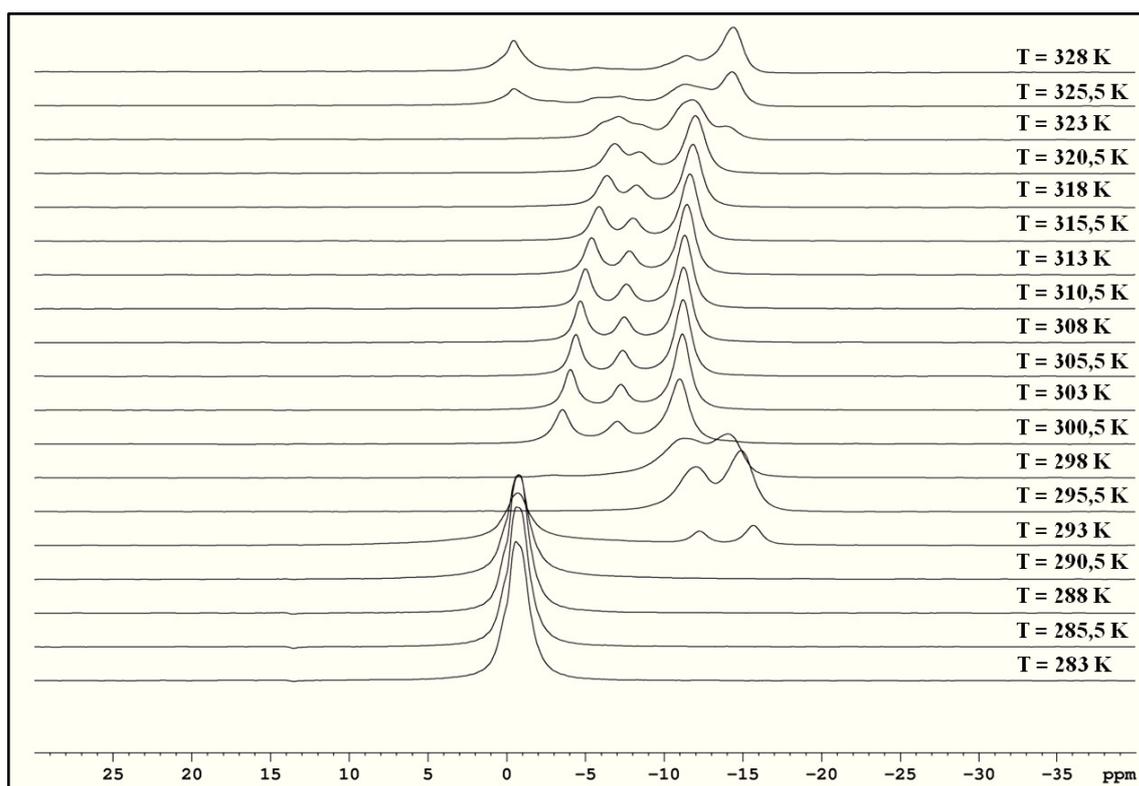


Abb. 56 ^{31}P -NMR-Spektren von DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen bei unterschiedlichen Temperaturen

DMPC/DMPG (80:20); $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; $\text{pH} = 6,8$

Die Temperaturserie von DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen (DMPC/DMPG 80:20) zeigt die Temperaturabhängigkeit der Ausbildung einer Orientierung im Magnetfeld (siehe Abb. 56). Bei Temperaturen bis ca. 290 K liegen gemischte Mizellen vor, was man an dem isotropen Signal bei 0 ppm erkennen kann. In diesem Temperaturbereich ist also keine Orientierung vorhanden. Ab 300 K bilden sich Bizellen aus, und man erkennt das charakteristische Bizellen-Spektrum, welches sich aus den drei Signalen der Kopfgruppen der drei Phospholipide zusammensetzt. Die zwei am weitesten hochfeldverschobenen Signale werden den Lipiden, welche in den planaren Bereichen der Bizellen vorliegen, zugerechnet (in diesem Beispiel DMPC und DMPG). Da sich Bizellen mit ihrer Flächennormalen senkrecht zum

Magnetfeld ausrichten, entspricht die Lage dieser Signale ihrer jeweiligen 90° -Orientierung im Pulverspektrum. Das am weitesten tieffeldverschobene Signal wird dem Lipid zugeordnet, welches die Ringfläche bildet (in diesem Beispiel 6-O-PC). Die Lage dieses Signals ist schon recht nahe an der isotropen Position, da die Orientierung durch die laterale Diffusion auf der Ringfläche schon nahezu ausgemittelt ist [179, 184]. Man erkennt, dass die Signale des Bizellen-Spektrums mit steigender Temperatur immer weiter hochfeldverschoben vorliegen. Daraus kann man schließen, dass die Orientierung immer ausgeprägter wird bis die Bizellen ab ca. 323 K in eine Vesikel- und eine Mizellenkomponente zerfallen. Die folgenden Festkörper-NMR Messungen in DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen (DMPC/DMPG 20:80) wurden daher bei einer Temperatur von 315 K durchgeführt, so dass auch bei einer leichten Aufheizung der Probe durch die Radiofrequenzstrahlung während der Messung die Bizellen nicht temperaturbedingt zerfallen.

Interessanterweise wurden in manchen Fällen Unterschiede in der Ausbildung der Bizellen beobachtet in Abhängigkeit von der Temperatur, bei der die Bizellen in das Spektrometer und somit in das Magnetfeld eingebracht wurden.

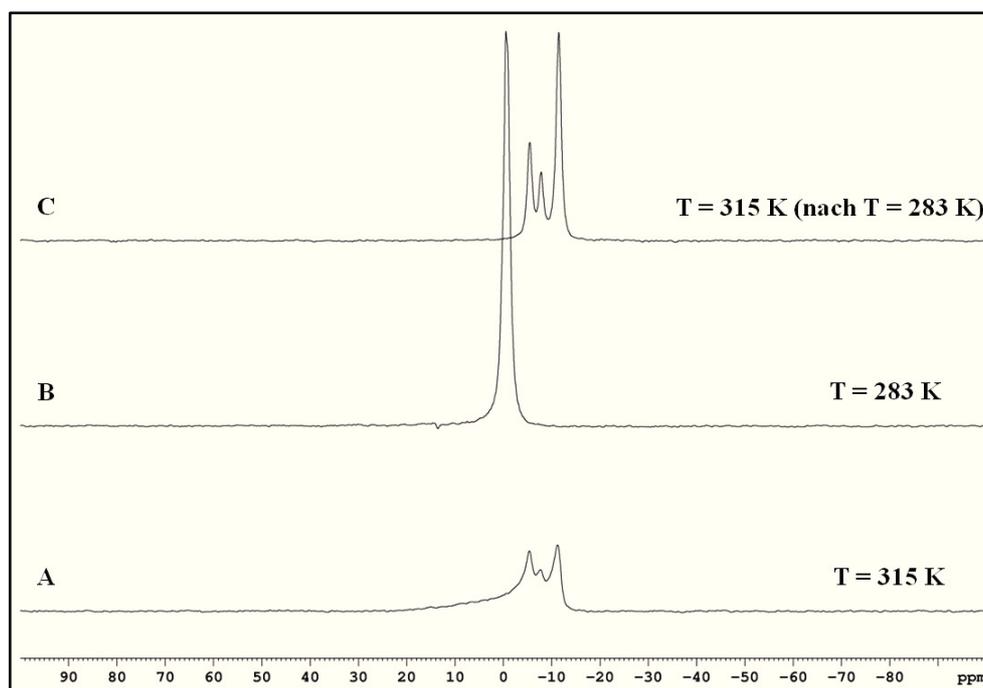


Abb. 57 **Temperaturabhängigkeit der Orientierungsbildung von DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen beim Einbringen in das Magnetfeld**
DMPC/DMPG (80:20); $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; pH = 6,8

So sind die oben bereits erwähnten DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen (DMPC/DMPG 80:20) nicht sehr gut orientiert, wenn sie bei Raumtemperatur in das Magnetfeld eingebracht werden (Abb. 57A). Das ^{31}P -NMR-Spektrum zeigt eine deutliche Schulter auf der linken Seite und

das Signal ist sehr verbreitert, wodurch die Signalintensität sehr viel geringer erscheint. Nach kurzer Inkubation bei 283 K im Magnetfeld (Abb. 57B), wobei gemischte Mizellen vorliegen, können sich die Bizellen bei einer Temperaturerhöhung neu ausrichten und zeigen bei 315 K (Abb. 57C) ein sehr gut orientiertes Bizellen-Spektrum. Dieser Effekt tritt aber nicht bei allen Bizellen-Mischungen auf. So ist er bei ungeladenen DMPC/6-O-PC-Bizellen kaum zu beobachten, und auch mit Lanthanoiden geflippte Bizellen zeigen dieses Verhalten nicht. Es wurde somit vor jeder Messung die Orientierung der Bizellen mit Hilfe eines ^{31}P -NMR-Spektrums überprüft.

Neben Bizellen, welche parallel zum Magnetfeld ausgerichtet sind, wurden auch sogenannte geflippte Bizellen verwendet. Im ungeflippten Zustand richten sich Bizellen parallel zum Magnetfeld aus, da sie eine negative magnetische Suszeptibilität aufweisen. Durch die Zugabe von Lanthanoid-Ionen mit großer, positiver magnetischer Suszeptibilität „flippen“ die Bizellen und orientieren sich nun senkrecht zum Magnetfeld. Hierbei binden die Lanthanoid-Ionen an die Phosphat-Kopfgruppen der Lipide und ändern dadurch die magnetische Suszeptibilität der Bizellen, was zu einer Orientierungsänderung im Magnetfeld führt [174, 185].

Hierdurch verdoppelt sich die spektrale Breite der chemischen Verschiebung und der dipolaren Kopplung. Wenn sich die Linienbreite durch das „Flippen“ der Bizellen nicht proportional mit der Spektrenbreite vergrößert, kann eine höhere Auflösung im Spektrum erzielt werden.

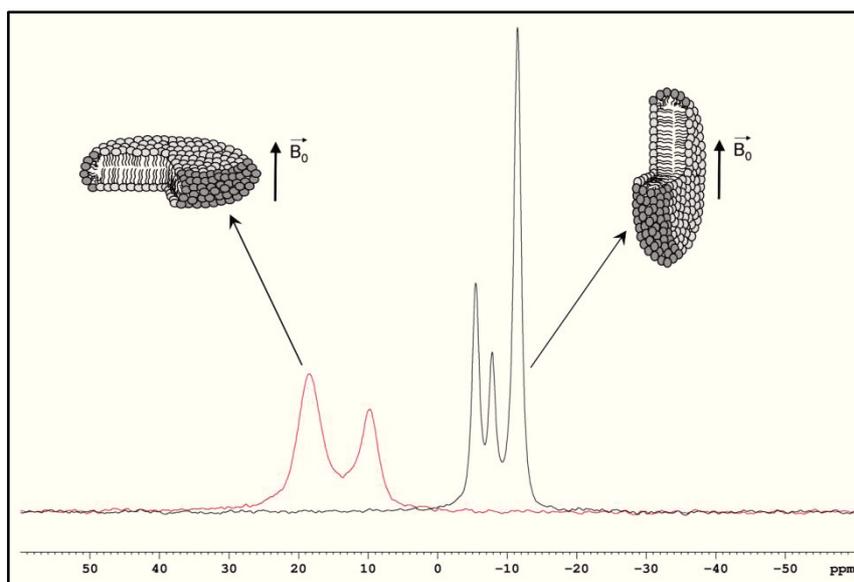


Abb. 58 ^{31}P -NMR-Spektren von geflippten und ungeflippten DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen

DMPC/DMPG (80:20); $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge, pH = 6,8

Rot: Bizellen geflippt mit 3 mM YbCl_3 ; Schwarz: Bizellen ungeflippt

Die ^{31}P -NMR-Spektren zeigen DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen in ungeflippten Zustand und geflippt mit 3 mM YbCl_3 (siehe Abb. 58). Man erkennt deutlich, dass beim Flippen mit Lanthanoid-Ionen das Signal der Bizellen im ^{31}P -NMR-Spektrum tieffeldverschoben vorliegt, welches durch die jetzt parallel zum Magnetfeld stehende Lipidlängsachse der Phospholipide hervorgerufen wird. Außerdem ist auch eine deutliche Linienverbreiterung im Vergleich zum ungeflippten Zustand zu erkennen, wodurch nicht mehr alle drei Signale der Phospholipide aufgelöst werden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Bizellen ein für die Festkörper-NMR sehr gut geeignetes Modellmembransystem darstellen, welches viele Möglichkeiten zur Probenoptimierung und –beeinflussung eröffnet.

4.3.2 1D- ^{15}N -NMR Messungen an TatA₂₋₄₅ in Bizellen

Für die Festkörper-NMR Messungen in Bizellen wurde schwerpunktmäßig das Fragment TatA₂₋₄₅ gewählt, welches um den unstrukturierten C-Terminus verkürzt ist. Deletionsexperimente hatten gezeigt, dass der C-Terminus für die Funktion des Proteins nicht notwendig ist [164, 186]. Das Protein TatA₂₋₄₅ enthält somit mit der N-terminalen transmembranen α -Helix und mit der amphiphilen auf der Membran aufliegenden α -Helix die beiden Sekundärstrukturelemente, welche mittels Festkörper-NMR genauer untersucht werden sollen. Der in diesem Fragment abgespaltene unstrukturierte C-Terminus könnte hingegen zu Signalen führen, welche im Bereich der amphiphilen Helix liegen und somit deren Zuordnung erschweren. Des Weiteren zeigte sich, dass sich TatA₂₋₄₅ im Vergleich zu dem Konstrukt TatA₂₋₇₀, welches zusätzlich noch den unstrukturierten C-Terminus besitzt, wesentlich besser in Bizellen rekonstituieren ließ.

Das uniform ^{15}N -markierte Protein TatA₂₋₄₅ wurde in DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen (DMPC/DMPG 80:20, $q = 3,2$, 22 % Gesamtlipidmenge) rekonstituiert und ein ^{15}N -NMR-Spektrum aufgenommen. Die Orientierung der Bizellen wurde mit Hilfe eines ^{31}P -NMR-Spektrums überprüft.

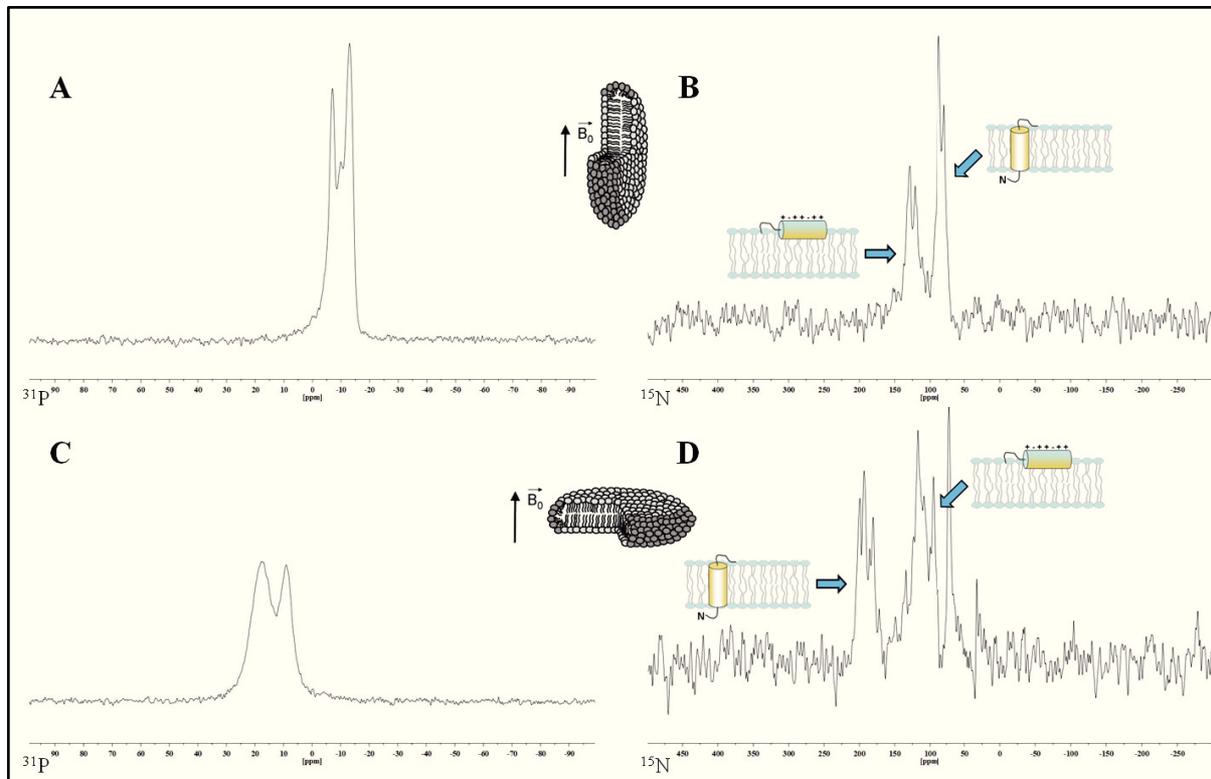


Abb. 59 TatA₂₋₄₅ in ungeflippten und geflippten DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen

A: ^{31}P -NMR-Spektrum und B: ^{15}N -NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in ungeflippten Bizellen.

C: ^{31}P -NMR-Spektrum und D: ^{15}N -NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in geflippten Bizellen.

($q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Die ungeflippten Bizellen sind im Gegensatz zu mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen mit ihrer Membrannormalen senkrecht zum Magnetfeld orientiert. Dies bedeutet, dass die zu messenden Proteine eine schnelle axialsymmetrische Bewegung durchführen müssen, um nicht ein Pulverspektrum zu ergeben [187]. Für nicht zu große Proteine ist dies aber im Allgemeinen der Fall [178, 185]. Ohne schnelle axialsymmetrische Bewegungen, wie der Rotationsdiffusion, würden die Proteine nicht alle die gleiche Orientierung zum Magnetfeld einnehmen, auch wenn die Orientierung zur Membrannormalen identisch ist, und somit ein breites Spektrum mit vielen Frequenzen hervorrufen.

Das ^{31}P -NMR-Spektrum (Abb. 59A) zeigt die sehr gute Orientierung der Bizellen, welche durch das rekonstituierte Protein nicht beeinflusst wird. Das zugehörige ^{15}N -NMR-Spektrum (Abb. 59B) zeigt die Signale des uniform markierten Proteins TatA₂₋₄₅, welches ebenfalls sehr gut orientiert ist. Im Falle einer schlechten Orientierung würde man zumindest einen gewissen Pulveranteil erwarten, da unter diesen Umständen nicht alle Moleküle die gleiche Orientierung zum Magnetfeld einnehmen. Bei einem aggregierten oder ungefalteten Protein würde man also ein Pulverspektrum erhalten, welches sich über die volle Breite des ^{15}N -Amide-CSA-Tensors erstrecken würde. Außerdem ist im Spektrum auch kaum Signalintensität im isotropen Bereich bei 120 ppm vorhanden, woraus man schließen kann, dass das Protein keine sich schnell bewegenden Anteile besitzt, wodurch sich die chemische Verschiebung auf ihren isotropen Wert ausmitteln würde. Man erkennt hingegen deutlich, dass sich die Signale in diesem Spektrum klar in zwei spektrale Regionen aufteilen. In dem Bereich von ca. 80 - 95 ppm würde man ein Proteinsegment erwarten, welches senkrecht zum Magnetfeld steht, und in dem Bereich von ca. 110 - 135 ppm ein Proteinsegment, welches parallel zu diesem steht. Betrachtet man die Orientierung der ungeflippten Bizellen, welche sich mit ihrer Membrannormalen senkrecht zum Magnetfeld ausrichten, werden die Signale im Bereich von ca. 80 - 95 ppm von der transmembranen α -Helix und im Bereich von 110 - 135 ppm von der flach auf der Membran aufliegenden amphiphilen Helix von TatA₂₋₄₅ hervorgerufen. Das Spektrum stimmt also sehr gut mit dem bereits mittels CD-Spektroskopie erstellten Strukturmodell überein.

Die Probe wurde durch Zugabe einer YbCl_3 -Lösung bis zu einer Endkonzentration von 3 mM geflippt, wodurch es zu einer Orientierungsänderung der Bizellen kommt, und diese nun mit ihrer Membrannormalen parallel zum Magnetfeld orientiert sind. Das entsprechende ^{31}P -NMR-Spektrum ist in Abb. 59C gezeigt. Durch diese Orientierungsänderung wird das Signal in den positiven Bereich des Spektrums gespiegelt. Es ist nun vergleichbar mit einem

³¹P-Spektrum von mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen, da nun die Kopfgruppen der Phospholipide ebenfalls parallel zum Magnetfeld orientiert sind und das Signal somit auf der positiven Seite des Spektrums liegt. Man erkennt außerdem, dass durch das Flippen eine Verbreiterung der Linien eingetreten ist.

Das Flippen bewirkt somit eine Spiegelung um die isotrope Position und eine Verdopplung der chemischen Verschiebungsdimension, da der Ordnungsparameter S_{zz} der Bizellen aufgrund der Orientierungsänderung der Membrannormalen zum Magnetfeld von 90° zu 0° von $S_{zz} = -1/2$ zu $S_{zz} = 1$ wechselt [174, 178, 185]:

$$S_{zz} \equiv \frac{(3\cos^2\theta - 1)}{2}$$

S_{zz} = Ordnungsparameter der Bizellen in zz-Richtung (Vorzugsrichtung);
 θ = Winkel der Membrannormalen zum Magnetfeld

Der Gesamtordnungsparameter S der Bizellen ist aber durch das „wobbeln“ um die mittlere Orientierung kleiner als eins, und somit ist die spektrale Breite trotzdem etwas kleiner als bei mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen [174].

Geflippte Bizellen haben generell noch den Vorteil, dass auch große Proteine gemessen werden können, welche keine schnelle Rotationsdiffusion entlang der Membrannormalen besitzen. Solche Proteine würden in ungeflippten Bizellen trotz gleicher Orientierung zur Membrannormalen eine Vielzahl von unterschiedlichen Orientierungen zum Magnetfeld einnehmen und somit zu einem zylindrischen Pulverspektrum führen [178, 185, 187].

Durch das Flippen der Probe können nun weitere wichtige Informationen gewonnen werden, so können zum Beispiel isotrope Signale identifiziert werden, da diese Signale auch nach dem Flippen an ihrer isotropen Position erscheinen. Außerdem kann der Vergleich von Signalen einer Probe in geflippten und ungeflippten Bizellen auch eine Zuordnung ermöglichen, wenn die entsprechende isotrope Position aus anderen Experimenten (zum Beispiel aus der Flüssigkeits-NMR mit isotropen Bizellen) bereits bekannt ist [188].

Das entsprechende ¹⁵N-NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in geflippten Bizellen (Abb. 59D) zeigt ebenfalls wieder eine sehr gute Orientierung. Die chemische Verschiebungsdimension ist verdoppelt, und die Signale sind aufgrund der Orientierungsänderung um ihre isotrope Position gespiegelt. Außerdem sind sie recht scharf, und es ist kein Pulveranteil zu erkennen. Die Zugabe von paramagnetischen Ionen (Yb³⁺ zum Flippen) hat also zu keiner starken Linienverbreiterung geführt, und somit konnte durch die Verdoppelung der chemischen Verschiebungsdimension Auflösung gewonnen werden. Das Spektrum zerfällt wieder in zwei spektrale Bereiche, wobei nach dem Flippen die Signale der transmembranen Helix

tieffeldverschoben zur isotropen Position sind (ca. 175 - 205 ppm) und entsprechend die Signale der amphiphilen Helix hochfeldverschoben zu dieser vorliegen (ca. 100 - 140 ppm). Weiterhin ist auffallend, dass die Signalintensität der amphiphilen Helix durch das Flippen der Bizellen deutlich verstärkt wurde. Auch sind nun drei weitere sehr scharfe Signale bei ca. 30 ppm, 75 ppm und 95 ppm zu erkennen. Das Signal bei 30 ppm war in der ungeflippten Probe kaum zu erkennen und die beiden anderen Signale wurden wahrscheinlich von den Signalen der transmembranen Helix überlagert. Diese isotropen Signale, deren Lage durch das Flippen der Probe nicht beeinflusst wurde, müssen also von schnell beweglichen Teilen des Proteins hervorgerufen werden, welche ebenfalls einen Stickstoff enthalten. Hierfür kommen nur die Seitenketten der Aminosäuren Arg, Lys, Gln, Asn und der N-Terminus mit seiner freien Amin-Gruppe in Frage, wobei das Protein TatA₂₋₄₅ nur die Aminosäuren Lys (3x), Arg (2x) und Asn (1x) enthält. Die Tabelle in Abb. 60 zeigt die isotropen chemischen Verschiebungen von ¹⁵N in den Amin-Gruppen der Seitenketten von Lys, Arg und Asn in Proteinen:

| Aminosäure | Lysin | Arginin | Asparagin |
|--|---|---|---|
| Isotrope Chemische Verschiebung | NZ = 31,00-43,69 ppm (Ø = 33,96 ppm) | NE = 75,15-99,81 ppm (Ø = 84,69 ppm) NH1 = 67,60-87,07 ppm (Ø = 73,64 ppm) NH2 = 70,10-85,28 ppm (Ø = 73,43 ppm) | ND2 = 99,4-133,86 ppm (Ø = 112,78 ppm) |

Abb. 60 ¹⁵N **isotrope chemische Verschiebungen der Amin-Gruppen in den Seitenketten von Lys, Arg, Asn [189, 190]**

Das Signal bei ca. 30 ppm ist charakteristisch für die Lysin-Seitenkette und den N-Terminus [191]. Das Signal bei ca. 75 ppm wird wahrscheinlich durch die beiden NH und das Signal bei ca. 95 ppm durch das NE der Guanidin-Gruppe der Arginin-Seitenkette hervorgerufen. Das Signal desamins der Asparagin-Seitenkette wird wahrscheinlich durch die Signale der amphiphilen Helix überlagert.

Wie bereits erwähnt sind für das Fragment TatA₂₋₄₅ im Gegensatz zu TatA₂₂₋₇₀ keine negativ geladenen Lipide zur Rekonstitution des Proteins in Modellmembranen nötig. Somit müssen nicht unbedingt die „sauren“ DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen verwendet werden, und es besteht hier die Möglichkeit zu prüfen, ob die negativ geladenen Lipide einen Einfluss auf die Orientierung des Proteins haben. Aus diesem Grund wurde das Protein TatA₂₋₄₅ auch in DMPC/6-O-PC-Bizellen (q = 3,2, 22 % Gesamtlipidmenge) rekonstituiert. Wie bereits zuvor

wurden die Messungen zuerst in ungeflippten Bizellen durchgeführt und anschließend wurden diese durch Zugabe einer YbCl_3 -Lösung bis zu einer Endkonzentration von 3mM geflippt.

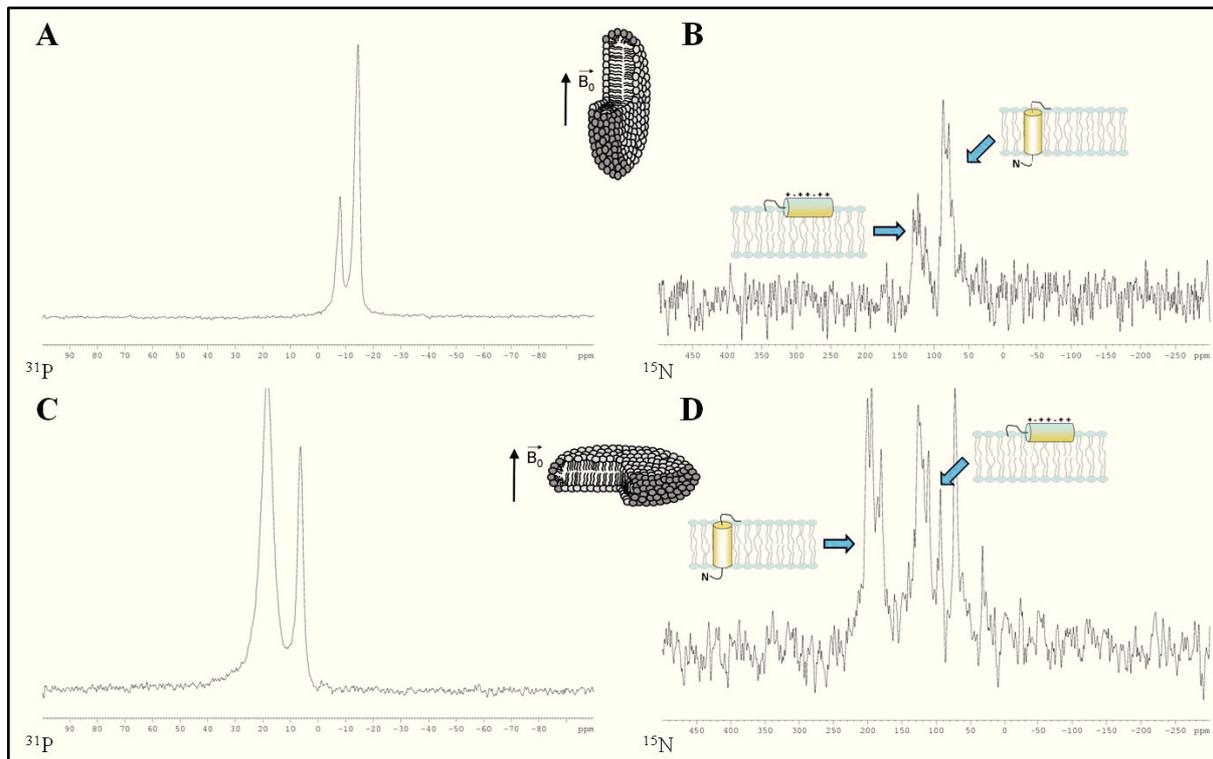


Abb. 61 TatA₂₋₄₅ in ungeflippten und geflippten DMPC/6-O-PC-Bizellen

A: ^{31}P -NMR-Spektrum und **B:** ^{15}N -NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in ungeflippten Bizellen.

C: ^{31}P -NMR-Spektrum und **D:** ^{15}N -NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in geflippten Bizellen.

($q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Man erkennt anhand der ^{31}P -NMR-Spektren (Abb. 61A+C), dass auch die Orientierung der DMPC/6-O-PC-Bizellen sowohl im geflippten als auch im ungeflippten Zustand sehr gut ist. Im Gegensatz zu den Bizellen mit DMPC und DMPG als langkettiges Lipid erhält man nur zwei Signale im ^{31}P -NMR-Spektrum. Das im Fall der ungeflippten Bizellen hochfeldverschobene Signal stammt dabei wieder von dem langkettigen Lipid DMPC, welches in den planaren Bereichen der Bizellen vorliegt. Dahingegen kann das zweite Signal in der Nähe der isotropen Region dem 6-O-PC zugeordnet werden, welches hauptsächlich in der Ringfläche der Bizellen vorliegt.

Die ^{15}N -NMR-Spektren zeigen das in den Bizellen rekonstituierte Protein TatA₂₋₄₅ (Abb. 61B+D). Auch bei diesen Spektren ist kein Unterschied zu den DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen feststellbar. Das Protein ist sehr gut orientiert und sowohl die Signale der transmembranen als auch der amphiphilen Helix haben sich gegenüber den Spektren in DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen nicht verschoben. Daraus lässt sich schließen, dass die negative Ladung in den DMPG-haltigen Bizellen keinen Einfluss auf die Orientierung von

TatA₂₋₄₅ besitzt. In den folgenden Messungen wurden aber trotzdem weiterhin die negativ geladenen Bizellen verwendet, da sie aufgrund ihrer Zusammensetzung eher als Modellsystem für eine bakterielle Membran geeignet sind.

4.3.3 2D-NMR Messungen an TatA₂₋₄₅ in Bizellen

Nachdem mit Hilfe der 1D-Spektren bestätigt wurde, dass die Rekonstitution des Proteins in Bizellen erfolgreich verlief, sollten weitere Messungen durchgeführt werden, um die Orientierung des Proteins in der Membran zu bestimmen. Für die Orientierungsmessung steht neben der chemischen Verschiebung auch die dipolare Kopplung in der Festkörper-NMR zur Verfügung. Aus der dipolaren Kopplung zweier kovalent gebundener Kerne kann der Winkel zum äußeren Magnetfeld recht einfach berechnet werden, da durch die chemische Bindung der Abstand der Kerne konstant bleibt und somit die Größe der dipolaren Kopplung nur vom Winkel zum äußeren Magnetfeld abhängt [192]. Besonders viel Orientierungsinformation kann gewonnen werden, wenn man die chemische Verschiebung mit der dipolaren Kopplung korreliert. Hierzu eignen sich insbesondere *Separated Local Field* (SLF) Experimente [193] wie beispielsweise das *Polarization Inversion with Spin Exchange at the Magic Angle* (PISEMA) [158]. Für die folgenden Messungen wurde jedoch das SAMMY-Experiment verwendet [160, 161]. Es wendet eine verbesserte Pulssequenz an, welche eine geringere Offset-Abhängigkeit besitzt und an kommerziellen Spektrometern leichter aufzusetzen ist. Das PISEMA- bzw. SAMMY-Experiment korreliert, wie bereits erwähnt, die chemische Verschiebung mit der dipolaren Kopplung. Für α -Helices ergeben sich charakteristische Signalmuster, sogenannte *Polarity Index Slant Angle* (PISA)-wheels, aus welchen die Orientierung des Proteins in der Membran abgelesen werden kann. Besonders interessant ist, dass für die Interpretation der PISA-wheels keine komplette Zuordnung nötig ist. Der Tiltwinkel τ der α -Helix kann direkt abgelesen werden, und für die Bestimmung der Polarität der Helix (Rotationswinkel ρ) ist generell schon die Zuordnung eines einzigen Signals ausreichend, da die Signale im PISA-wheel wie in einem *helical-wheel plot* [194] in einer wohldefinierten Reihe angeordnet sind.

Es wurde ein SAMMY-Spektrum von uniform ¹⁵N-markierten TatA₂₋₄₅ rekonstituiert in DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen (DMPC/DMPG 80:20; q = 3,2; 22 % Gesamtlipidmenge) bei 315 K aufgenommen (siehe Abb. 62). Da das Fragment TatA₂₋₄₅ aus einer transmembranen und einer amphiphilen auf der Membran aufliegenden α -Helix besteht, würde man im SAMMY-Spektrum zwei getrennte PISA-wheels erwarten, welche die Orientierung der beiden α -Helices in der Membran widerspiegeln. Somit wäre die Bestimmung der

Kippwinkel τ für die beiden α -Helices ohne weitere Zuordnung möglich, und das mit Hilfe der CD-Spektroskopie gewonnene Strukturmodell des Proteins TatA_d könnte weiter verfeinert werden.

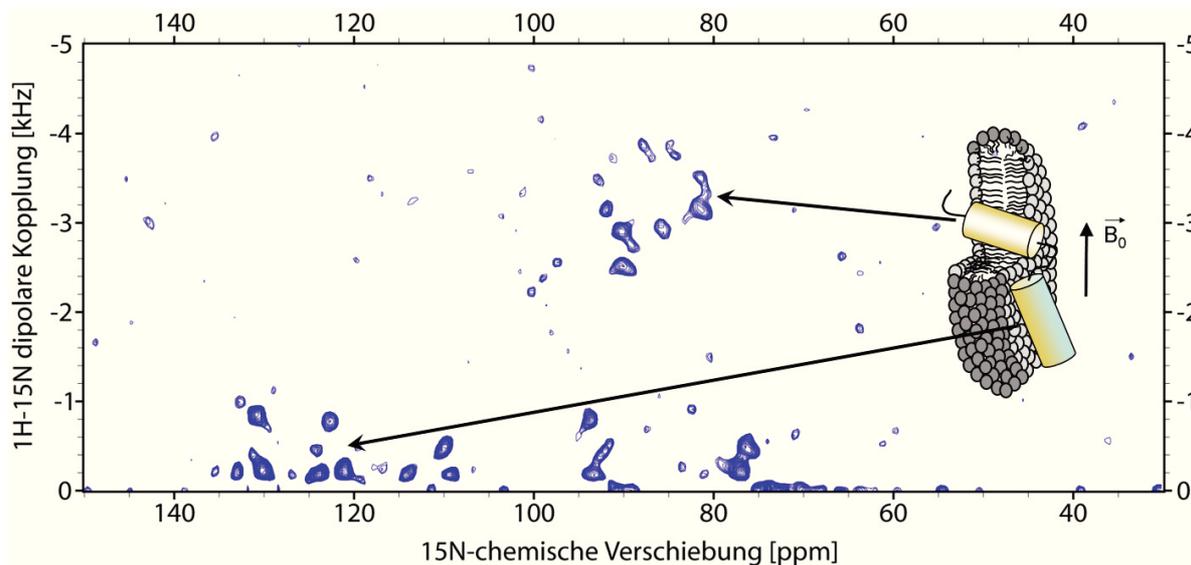


Abb. 62 **SAMMY-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen**
DMPC/DMPG 80:20; $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipid; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K

Das SAMMY-Spektrum zeigt ein sehr gut aufgelöstes PISA-wheel (siehe Abb. 62). Die Lage des PISA-wheels bei ca. 80 - 95 ppm ¹⁵N-chemischer Verschiebung und ca. 2,5 - 3,9 kHz ¹H-¹⁵N-dipolarer Kopplung erlaubt unter Berücksichtigung, dass die Messung in ungeflippten Bizellen durchgeführt wurde, eine Zuordnung zur transmembranen α -Helix. Neben den Signalen der transmembranen α -Helix, sind noch eine Reihe weiterer Signale im Bereich von 0 - 1,2 kHz dipolarer Kopplung erkennbar. Diese können zum einen von der amphiphilen α -Helix, zum anderen von der Loop-Region zwischen transmembraner und amphiphiler α -Helix, oder aber auch von den Amin-Enden der Seitenketten hervorgerufen werden. Sie sind zwar ebenfalls gut aufgelöst, aber da die Signale der amphiphilen α -Helix, welche im Bereich von ca. 110 - 135 ppm chemischer Verschiebung erwartet werden, kein direkt erkennbares PISA-wheel bilden, ist eine genaue und abschließende Zuordnung bzw. Unterscheidung nur schwer möglich. Das Flippen der Probe soll durch einen Vergleich der beiden erhaltenen SAMMY-Spektren die isotropen Signale identifizierbar machen, da diese auch nach dem Flippen an ihrer isotropen Position verbleiben. Somit ist vielleicht eine genauere Zuordnung von Signalen zur amphiphilen α -Helix möglich.

Die folgende Abbildung zeigt einen Vergleich von SAMMY-Spektren und den zugehörigen ¹⁵N-NMR-Spektren des Proteins TatA₂₋₄₅ in ungeflippten und geflippten DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen (DMPC/DMPG 80:20, $q = 3,2$, 22 % Gesamtlipid).

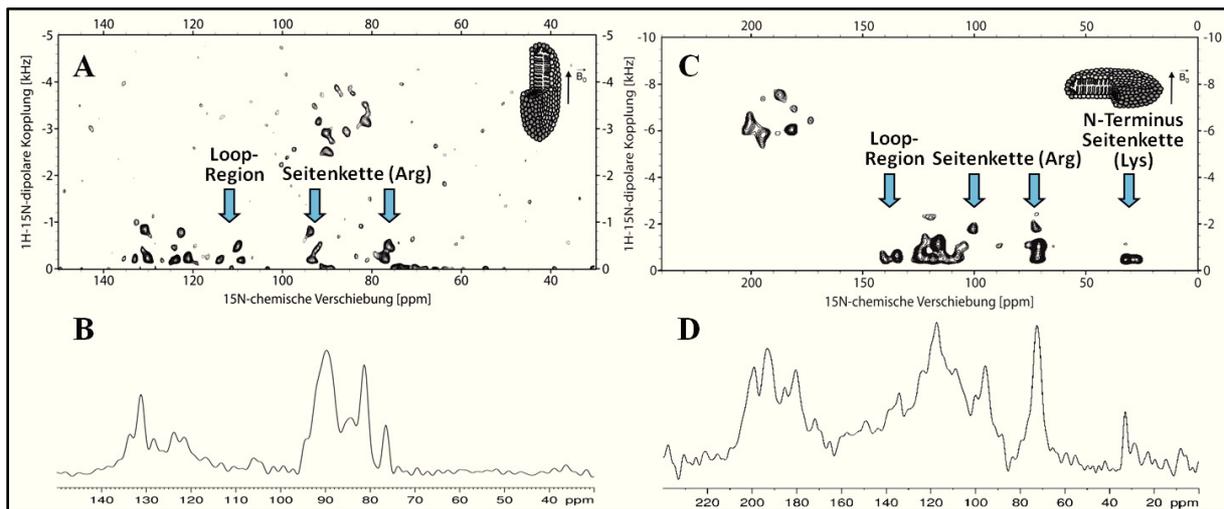


Abb. 63 SAMMY-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in ungeflippten und geflippten DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen

A: SAMMY-Spektrum und **B:** ¹⁵N-NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in ungeflippten Bizellen.
C: SAMMY-Spektrum und **D:** ¹⁵N-NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in geflippten Bizellen.
 (DMPC/DMPG 80:20; q = 3,2; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Ein Vergleich der SAMMY-Spektren von TatA₂₋₄₅ in ungeflippten (Abb. 63A) und geflippten Bizellen (Abb. 63C) zeigt, dass die Signalbreite im Falle der geflippten Probe deutlich zugenommen hat. Obwohl die Signalintensität insbesondere im amphiphilen Bereich erhöht werden konnte, ist durch die Verbreiterung keine bessere Auflösung erzielt worden. Die Signale im Spektrum der ungeflippten Probe sind deutlich besser separiert, jedoch ist hier das Signal-zu-Rausch Verhältnis schlechter.

Durch den Vergleich der beiden Spektren lassen sich aber trotzdem wichtige Informationen gewinnen. So lassen sich die Signale bei ca. 75 ppm (NH1 und NH2) und ca. 95 ppm chemischer Verschiebung (NE), wie schon bei der Betrachtung 1D-¹⁵N-NMR-Spektren, der Guanidin-Gruppe der Arginin-Seitenketten zuordnen (vergleiche Abb. 60). Die leichte Änderung der chemischen Verschiebung dieser Signale um ca. 3 - 5 ppm, die beim Flippen der Probe zu beobachten ist, lässt darauf schließen, dass die Seitenketten nicht komplett isotrop ausgemittelt vorliegen und somit eine Restorientierung vorhanden ist. Ebenso würde man ein komplett ausgemittelt Signal bei 0 kHz dipolarer Kopplung erwarten, wohingegen die Seitenketten-Signale in den gemessenen SAMMY-Spektren bei ca. 0 - 1 kHz (bzw. 0 - 2 kHz bei der geflippten Probe) zu beobachten sind. Hier spielen aber möglicherweise neben der Restorientierung auch noch sogenannte *truncation wiggles* Artefakte eine Rolle, die entstehen, wenn das FID am Ende der Akquisitionszeit noch nicht auf Null abgefallen ist. Die Amin-Gruppe der Lysin-Seitenkette bzw. des N-Terminus ist wieder nur im Spektrum der geflippten Probe bei ca. 30 ppm chemischer Verschiebung und 0,5 kHz dipolarer Kopplung

zu erkennen, wohingegen das Signal der Amin-Gruppe der Asparagin-Seitenkette wahrscheinlich von den Signalen der amphiphilen Helix überlagert ist.

Neben den Seitenketten-Signalen ist in beiden SAMMY-Spektren zu erkennen, wie sich die weiteren Signale in zwei spektrale Bereiche aufteilen, welche, wie bereits erwähnt, der amphiphilen und transmembranen α -Helix zuzuordnen sind. Durch das Flippen der Probe werden die Signale der transmembranen Helix von ca. 80 - 95 ppm chemischer Verschiebung und ca. 2,5 - 3,9 kHz dipolarer Kopplung zu ca. 175 - 205 ppm und ca. 5 - 7,8 kHz verschoben.

Bei genauerer Betrachtung der Signale der amphiphilen Helix erkennt man, dass diese ebenfalls wieder in zwei Gruppen zerfallen. Die Signale bei ca. 108 - 115 ppm chemischer Verschiebung und ca. 0 - 0,5 kHz dipolarer Kopplung der ungeflippten Probe (bzw. ca. 132 - 142 ppm und ca. 0 - 0,9 kHz bei der geflippten Probe) können vielleicht der Region zwischen der transmembranen und der amphiphilen α -Helix zugeordnet werden (Loop-Region). Die amphiphile α -Helix würde somit Signale in der ungeflippten Probe bei ca. 119 - 133 ppm chemischer Verschiebung und ca. 0 - 0,9 kHz dipolarer Kopplung bzw. im Falle der geflippten Probe bei ca. 102 - 128 ppm und ca. 0 - 1,6 kHz hervorrufen.

- **Bestimmung des Tiltwinkels τ und des Ordnungsparameters S**

Um diese Vermutung zu bestätigen und um die genaue Orientierung der beiden α -Helices aus den PISA-*wheels* zu erhalten, wurden nun für verschiedene Tiltwinkel τ der α -Helix PISA-*wheels* simuliert und an die experimentell erhaltenen Daten angefitet.

Für die Simulationen wurde als erste Näherung eine ideale α -Helix mit uniformen Diederwinkeln ($\Phi = -60,7^\circ$, $\Psi = -44,7^\circ$) angenommen. Außerdem sind zur Simulation der Spektren noch die Kenntnis der Orientierung und der Größe der Tensoren der ^{15}N chemischen Verschiebung und ^1H - ^{15}N dipolaren Kopplung notwendig.

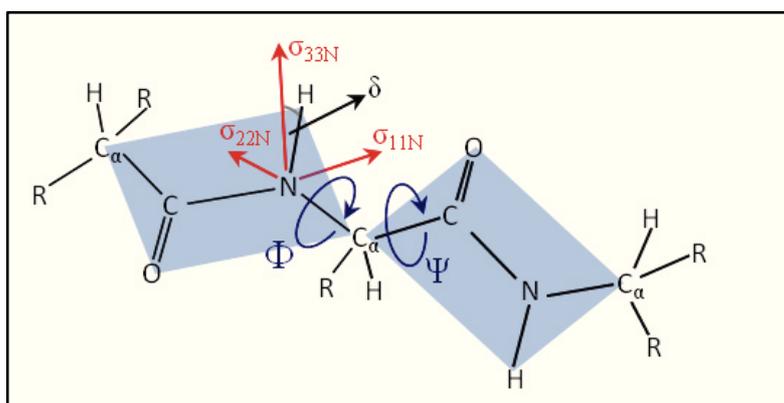


Abb. 64 **Darstellung der Diederwinkel und ^{15}N -chemischen Verschiebungstensor Hauptachsenwerten in der Peptidebene**

Abbildung verändert übernommen aus [156].

Die Abb. 64 zeigt die Lage der Diederwinkel und der ^{15}N -chemischen Verschiebungstensor Hauptachsenwerte in einer Peptidebene. Da die Amidbindung aufgrund ihres Doppelbindungscharakters nicht frei drehbar ist, ist eine Drehung nur um die Bindung $\text{N}-\text{C}_\alpha$ (Diederwinkel Φ) und $\text{C}_\alpha-\text{CO}$ (Diederwinkel Ψ) möglich. Die Dieder- oder Torsionswinkel Φ und Ψ definieren somit die Konformation eines Proteins.

Der Winkel zwischen dem Hauptachsenwert $\sigma_{33\text{N}}$ des ^{15}N -chemischen Verschiebungstensors und der NH -Bindung, in dessen Richtung auch die Hauptachse des Dipol-Dipol-Tensor liegt, wird als δ bezeichnet. Die Hauptachsenwerte des chemischen Verschiebungstensors sind ebenso wie der Winkel δ in der Literatur bekannt. Diese Größen können experimentell z. B. anhand von 3D-Korrelationsspektren von Pulverproben bestimmt [195] oder auch quantenchemisch berechnet werden [196]. Jedoch sind diese Werte nicht für alle Atome identisch und somit beeinflusst ihre Wahl, ebenso wie Abweichungen von einer idealen α -Helix-Geometrie, die Form und die Lage des berechneten PISA-*wheels* [197]. Als erste Näherung können jedoch gemittelte uniforme chemische Verschiebungstensoren und ein

gemittelter uniformer Winkel δ verwendet werden, wobei in dieser Arbeit die Werte aus [198] Anwendung finden.

Für die Simulation von PISA-wheels wurde das Programm *opisawheel* von Dr. Stephan Grage (Universität Karlsruhe) verwendet.

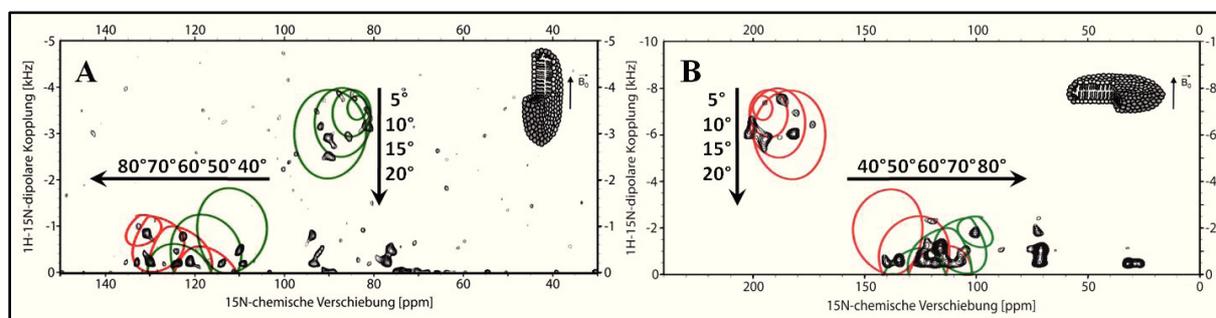


Abb. 65 Bestimmung des Tiltwinkels τ der transmembranen und der amphiphilen α -Helix von TatA₂₋₄₅

A: SAMMY-Spektrum von TatA₂₋₄₅ überlagert mit simulierten PISA-wheels in ungeflippten Bizellen und **B:** in geflippten Bizellen.

(DMPC/DMPG 80:20; $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Simulationen wurden durchgeführt für eine ideale α -Helix mit uniformen Diederwinkeln ($\Psi = -44,7^\circ$; $\Phi = -60,7^\circ$), uniformen chemischen Verschiebungstensor Hauptachsenwerten ($\sigma_{11N} = 64$ ppm; $\sigma_{22N} = 77$ ppm; $\sigma_{33N} = 222$ ppm) und einem uniformen Winkel zwischen σ_{33N} und dem NH-Vektor $\delta = 18,5^\circ$.

Transmembraner Bereich: Tiltwinkel $\tau = 5^\circ - 20^\circ$ und Ordnungsparameter $S = 0,8$

Amphiphiler Bereich: Tiltwinkel $\tau = 40^\circ - 80^\circ$ und Ordnungsparameter $S = 0,5$

In der Abb. 65 sind die SAMMY-Spektren von TatA₂₋₄₅ in ungeflippten und geflippten DMPC/DMPG-Bizellen überlagert mit den simulierten PISA-wheels gezeigt. Für die transmembrane Region werden PISA-wheels mit einem Tiltwinkel von $5^\circ - 20^\circ$ und für die amphiphile Region werden PISA-wheels mit einem Tiltwinkel von $40^\circ - 80^\circ$ dargestellt.

Durch einen Vergleich der simulierten PISA-wheels mit der erhaltenen Signalverteilung der uniform markierten Probe lässt sich ohne weitere Zuordnung bereits der Tiltwinkel τ der α -Helix bestimmen. Somit ergibt sich für die transmembrane α -Helix ein Tiltwinkel von 13° , wobei man erkennen kann, dass eine Änderung des Tiltwinkels τ um 5° schon eine deutliche Änderung der Lage und Größe des PISA-wheels hervorruft, weshalb der mögliche Fehler auf ca. 4° abgeschätzt wurde.

Für die amphiphile α -Helix ist der Tiltwinkel τ etwas schwieriger zu bestimmen. Zum einen liegen die Signale für diese Tiltwinkel nahe bei 0 kHz dipolarer Kopplung und somit in einem Bereich, der für Störungen sehr anfällig ist. Zum anderen ist bei Tiltwinkeln von ca. $40^\circ - 70^\circ$ zu beobachten, dass es zur Überlappung zweier PISA-wheels kommt, die aus den Dupletts der Dipolkopplung entstehen (in Abb. 65 rot markiert). Dies kommt dadurch zu Stande, dass bei diesen Signalen des PISA-wheels das Vorzeichen der dipolaren Kopplung wechselt. Sie

liegen somit normalerweise auf der symmetrischen unteren Hälfte des SAMMY-Spektrums, welches aufgrund der redundanten Information in den Abbildungen nicht gezeigt wird.

Für die Signale im Bereich von 108 - 133 ppm chemischer Verschiebung ist es unter der Annahme einer durchgängigen idealen α -Helix nicht möglich, ein *PISA-wheel* zu simulieren, welches alle im Spektrum vorhandenen Signale einschließt. Wie aber bereits erwähnt, ist bei genauerer Betrachtung der Signale in diesem Bereich eine weitere Aufteilung in zwei Gruppen zu beobachten. Somit ist es möglich, dass die Signale bei 108 - 115 ppm chemischer Verschiebung zu einer Loop-Region zwischen der transmembranen und der amphiphilen α -Helix gehören. Für die verbliebenen Signale bei 119 - 133 ppm chemischer Verschiebung kann ein *PISA-wheel* simuliert werden, welches die Signalverteilung recht gut widerspiegelt und einen Tiltwinkel τ von 64° für die amphiphile Helix ergibt. Aufgrund der erwähnten Unsicherheiten ist in diesem Fall ein größerer Fehler anzunehmen, welcher auf ca. 10° abgeschätzt wurde. Selbst wenn sich die Zuordnung der Signale bei 108 - 115 ppm chemischer Verschiebung zur Loop-Region als falsch herausstellen würde, so kann der Tiltwinkel τ der amphiphilen α -Helix aufgrund der erhaltenen Signalverteilung der uniform markierten Probe nur im Bereich von 50° - 70° liegen.

Das Modell einer starren α -Helix mit einem festen Tiltwinkel τ ist natürlich nicht zutreffend, da sich Proteinsegmente in der Membran bewegen können (siehe Abb. 66). Um diese Bewegungsausmittelung in die Simulationen mit einzubeziehen wurde in den Berechnungen ein sogenannter Ordnungsparameter S verwendet, welcher den Grad der Ordnung beschreibt.

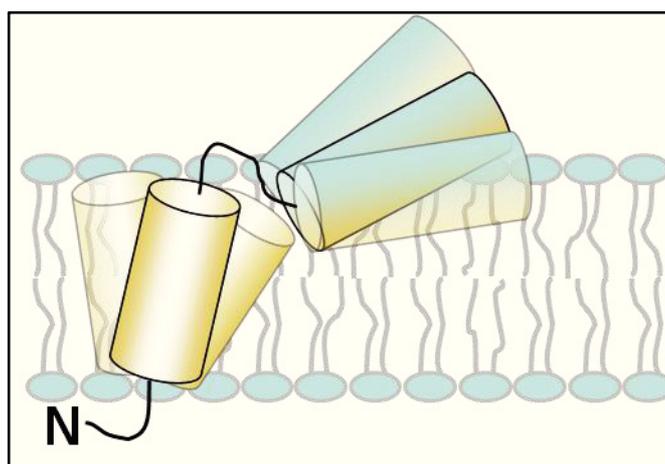


Abb. 66 **Bewegungsausmittelung im Molekül**

Die Annahme einer komplett bewegungslosen α -Helix mit einem festen Tiltwinkel τ würde einem Ordnungsparameter $S = 1$ entsprechen. Je kleiner der Ordnungsparameter S , desto mehr Bewegungsausmittelung ist in den Simulationen enthalten. Die Beschreibung der

Dynamik mit nur einem Ordnungsparameter S kann jedoch nicht zwischen verschiedenartigen Bewegungen unterscheiden und stellt somit nur ein vereinfachtes, jedoch für erste Abschätzungen ausreichendes Mittel zur Beschreibung der globalen Bewegung dar. Für eine genauere Betrachtung müsste anstatt eines einzelnen Ordnungsparameters S eine Ordnungsparameter-Matrix verwendet werden, welche in der Lage ist zwischen verschiedenartigen Bewegungen zu differenzieren, anstatt nur eine globale Bewegung zu beschreiben.

Um den Einfluss des Ordnungsparameters auf die Form und die Lage der simulierten PISA-*wheels* abschätzen zu können, wurden Simulationen mit verschiedenen Ordnungsparametern S sowohl für die amphiphile, als auch für die transmembrane α -Helix durchgeführt (Abb. 67).

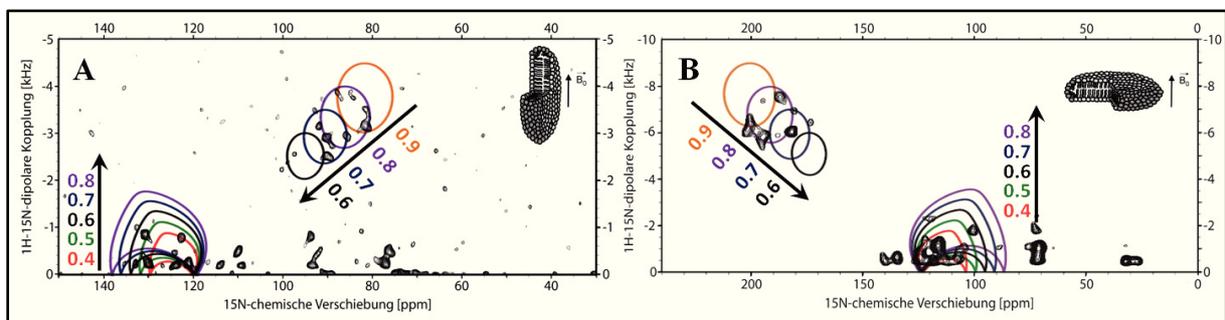


Abb. 67 Bestimmung des Ordnungsparameters S der transmembranen und der amphiphilen α -Helix von TatA₂₋₄₅

A: SAMMY-Spektrum von TatA₂₋₄₅ überlagert mit simulierten PISA-*wheels* in ungeflippten Bizellen und **B:** in geflippten Bizellen.

(DMPC/DMPG 80:20; $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Simulationen wurden durchgeführt für eine ideale α -Helix mit uniformen Diederwinkeln ($\Psi = -44,7^\circ$; $\Phi = -60,7^\circ$), uniformen chemischen Verschiebungstensor Hauptachsenwerten ($\sigma_{11N} = 64$ ppm; $\sigma_{22N} = 77$ ppm; $\sigma_{33N} = 222$ ppm) und einem uniformen Winkel zwischen σ_{33N} und dem NH-Vektor $\delta = 18,5^\circ$.

Transmembraner Bereich: Tiltwinkel $\tau = 13^\circ$ (geflippt: $\tau = 12^\circ$) und Ordnungsparameter $S = 0,6 - 0,9$

Amphiphiler Bereich: Tiltwinkel $\tau = 64^\circ$ und Ordnungsparameter $S = 0,4 - 0,8$

Man erkennt deutlich, dass der Ordnungsparameter S einen recht großen Einfluss auf die Signalverteilung hat. Mit abnehmenden Ordnungsparameter S nimmt die Größe des PISA-*wheels* immer weiter ab. Bei einem Ordnungsparameter $S = 0$ wäre keine Vorzugsorientierung mehr vorhanden und die Signale würden alle in einem Punkt zusammenfallen.

Für die transmembrane α -Helix sind simulierte PISA-*wheels* für einen Ordnungsparameter $S = 0,6 - 0,9$ gezeigt. Das PISA-*wheel* verschiebt sich mit zunehmendem Ordnungsparameter S zu immer größeren dipolaren Kopplungen und wird außerdem, wie bereits erwähnt, größer. Der Ordnungsparameter S für die transmembrane α -Helix lässt sich somit auf $S = 0,8$ bestimmen. Eine Änderung des Ordnungsparameters um $S = 0,1$ bewirkt bereits eine deutliche Verschiebung des PISA-*wheels*, weshalb der Fehler durch das Anfitzen an die experimentell erhaltene Signalverteilung auf $S = 0,03$ abgeschätzt wurde.

Für die amphiphile α -Helix sind simulierte PISA-*wheels* für einen Ordnungsparameter $S = 0,4 - 0,8$ gezeigt. Man erkennt auch in diesem Fall, dass das PISA-*wheel* mit zunehmendem Ordnungsparameter S immer größer wird, wobei es sich im Falle der ungeflippten Probe in Richtung tieferes Feld und bei der geflippten Probe entsprechend in Richtung höheres Feld ausdehnt. Ein Vergleich mit der experimentell erhaltenen Signalverteilung ergibt im Falle der ungeflippten Probe einen Ordnungsparameter von $S = 0,5$ und im Falle der geflippten Probe von $S = 0,4$. Der Fehler für den Ordnungsparameter S für die amphiphile α -Helix wird im Vergleich zur transmembranen α -Helix deutlich größer auf $S = 0,15$ abgeschätzt, da in diesem Bereich zum einen die Lage des PISA-*wheels* weniger stark vom Ordnungsparameter beeinflusst wird und zum anderen die Datenlage schlechter ist.

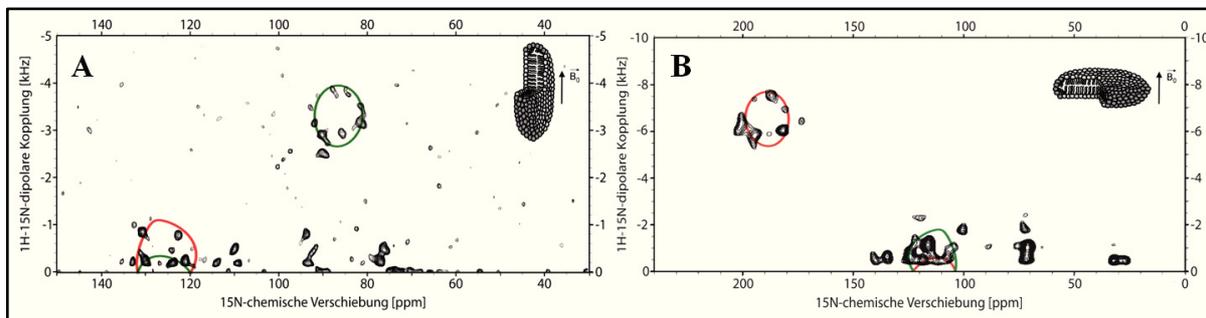


Abb. 68 Ordnungsparameter S und Tiltwinkel τ der transmembranen und der amphiphilen α -Helix von TatA_{2-45}

A: SAMMY-Spektrum von TatA_{2-45} überlagert mit simuliertem PISA-*wheel* in ungeflippten Bizellen und **B:** in geflippten Bizellen.

(DMPC/DMPG 80:20; $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Simulationen wurden durchgeführt für eine ideale α -Helix mit uniformen Diederwinkeln ($\Psi = -44,7^\circ$; $\Phi = -60,7^\circ$), uniformen chemischen Verschiebungstensor Hauptachsenwerten ($\sigma_{11N} = 64$ ppm; $\sigma_{22N} = 77$ ppm; $\sigma_{33N} = 222$ ppm) und einem uniformen Winkel zwischen σ_{33N} und dem NH-Vektor $\delta = 18,5^\circ$.

Transmembraner Bereich: Tiltwinkel $\tau = 13^\circ$ (geflippt: 12°) und Ordnungsparameter $S = 0,79$ (geflippt: 0,77)

Amphiphiler Bereich: Tiltwinkel $\tau = 64^\circ$ (geflippt: 64°) und Ordnungsparameter $S = 0,5$ (geflippt: 0,4)

Aus den erhaltenen SAMMY-Spektren (siehe Abb. 68) lässt sich demnach die Orientierung der transmembranen α -Helix zu einem Tiltwinkel $\tau = 13^\circ \pm 4^\circ$ und einem Ordnungsparameter $S = 0,8 \pm 0,03$ bestimmen. Der Fit für die transmembrane α -Helix in geflippten Bizellen ergibt mit einem Tiltwinkel von $\tau = 12^\circ$ und einem Ordnungsparameter $S = 0,8$ leicht andere Werte, welche jedoch noch innerhalb des abgeschätzten Fehlers liegen.

Für die amphiphile α -Helix ergibt sich ein Tiltwinkel $\tau = 64^\circ \pm 10^\circ$ und ein Ordnungsparameter von $S = 0,5 \pm 0,15$. In geflippten Bizellen ergibt sich für diese Helix bei gleichem Tiltwinkel τ ein Ordnungsparameter $S = 0,4$, welcher ebenfalls noch innerhalb des abgeschätzten Fehlers liegt.

- **Selektiv markierte Proben und Bestimmung des Rotationswinkel ρ**

Aus den uniform markierten Proben ist die Bestimmung des Tiltwinkels τ und des Ordnungsparameters S möglich. Zur vollständigen Beschreibung der Orientierung einer Helix in einer Membran ist jedoch noch ein weiterer Parameter notwendig, welcher die Drehung der Helix bestimmt und als Rotationswinkel ρ bezeichnet wird.

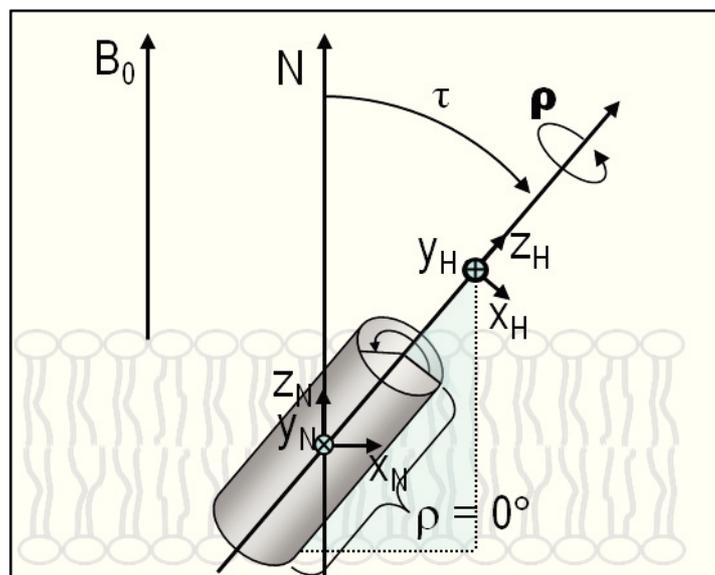


Abb. 69 Definition des Rotationswinkels ρ

Abbildung verändert übernommen aus [199].

Die Achsen x_N , y_N , z_N bilden das rechtshändige Koordinatensystem der Membran (z_N = Membrannormale).

Die Achsen x_H , y_H , z_H bilden das rechtshändige Koordinatensystem der Helix (wobei $y_H = y_N$).

Wie in der Abb. 69 zu erkennen ist, gibt der Rotationswinkel ρ die Lage des C_α -Atoms einer Aminosäure auf der Helixoberfläche an, wodurch aufgrund der Periodizität in einer α -Helix auch die Lage aller weiteren Aminosäuren gegeben ist.

Die Achse z_N entspricht der Membrannormalen N . Die Achse z_H des Helixkoordinatensystems verläuft parallel zur Helixachse in Richtung vom N-Terminus zum C-Terminus der α -Helix. Die Achse y_N des Membrankoordinatensystems ist identisch mit der Achse y_H des Koordinatensystems der Helix, welche beide in die Papierebene hinein zeigen. Diese Achse bildet die Drehachse für den Tiltwinkel τ , welcher als eine Rechtsdrehung von der Membrannormalen N um diese Achse definiert ist ($\tau = 0$, wenn $z_H = z_N$).

Der azimuthale Rotationswinkel ρ beschreibt eine Rechtsdrehung um die Helixachse z_H und definiert somit die Lage des C_α -Atoms einer bestimmten Aminosäure auf der Helixoberfläche. In dieser Arbeit wird der Rotationswinkel $\rho = 0$ als Kreuzprodukt der Drehachse des Tiltwinkels τ (\vec{y}_N bzw. \vec{y}_H) und der Helixachse (\vec{z}_H) definiert. Der hieraus resultierende

Vektor \vec{x}_H bildet zusammen mit dem Vektor \vec{z}_H eine Ebene (blau schraffierter Bereich in der Abbildung), welcher die Lage des Rotationswinkels $\rho = 0$ auf der Helixoberfläche verdeutlicht.

Zur Bestimmung des Rotationswinkels ρ aus einem PISEMA- bzw. SAMMY-Spektrum ist eine Zuordnung der Signale im PISA-wheel notwendig. Aufgrund der Periodizität von α -Helices ist es im Grunde möglich, die Zuordnung und somit auch den Rotationswinkel ρ mit Hilfe einer einzigen selektiv markierten Probe zu erhalten.

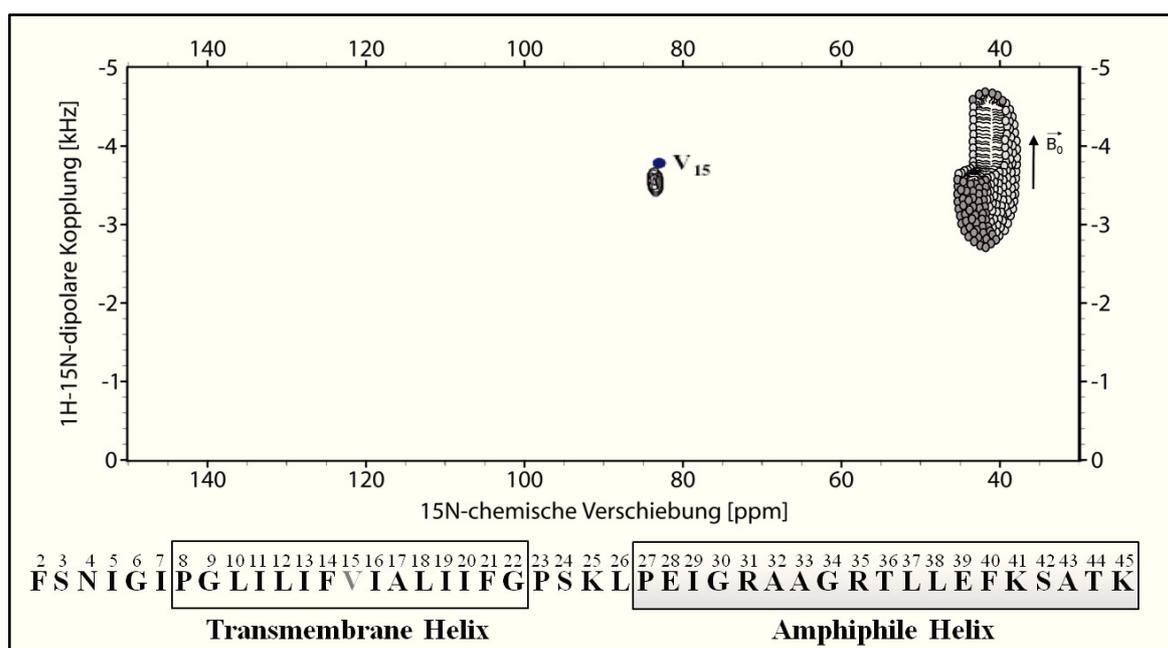


Abb. 70 SAMMY-Spektrum von ^{15}N -Val-TatA₂₋₄₅

Überlagert mit einem simulierten Spektrum: $\tau = 13^\circ$; $S = 0,79$; $\rho_{\text{Val15}} = 235^\circ$.
(DMPC/DMPG 80:20; $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Die Abb. 70 zeigt das SAMMY-Spektrum von selektiv ^{15}N -Valin markiertem TatA₂₋₄₅ in ungeflippten Bizellen. Zudem ist die, in transmembrane und amphiphile Helix unterteilte, Aminosäuresequenz des Proteins angegeben. Die Einteilung zur transmembranen bzw. amphiphilen Helix wurde zuerst aufgrund der CD-Ergebnisse und der Aminosäuresequenz durchgeführt. Die Aminosäure Prolin ist ein bekannter Helixbrecher, da sie aufgrund des Fehlens eines Protons am Amidstickstoff keine Wasserstoffbrücke ausbilden kann. Die beiden Helixsegmente wurden dabei so gewählt, dass sie von den Prolinen flankiert werden. Die amphiphile Helix ist in dem Protein TatA₂₋₄₅ wahrscheinlich nicht bis zum C-Terminus durchgängig, da dieser immer eine erhöhte Mobilität aufweist und somit nicht mehr so gut strukturiert ist. Im Protein TatA₂₋₇₀ ist die amphiphile Sequenz sicher etwas länger, weshalb die amphiphile Helix bis zum Ende der Sequenz eingezeichnet wurde. Eine genauere

Untersuchung der Länge der beiden Helixsegmente erfolgt später bei der Betrachtung der Flüssigkeits-NMR Daten.

Das SAMMY-Spektrum von selektiv ^{15}N -Valin markiertem TatA₂₋₄₅ zeigt erwartungsgemäß nur ein Signal im transmembranen Bereich des Spektrums, da mit Val₁₅ nur ein einziges Valin im gesamten Protein enthalten ist. Dieses Signal ermöglicht eine Bestimmung des Rotationswinkels ρ der Transmembranhelix, da durch diese selektiv markierte Probe nun das entsprechende Signal zugeordnet ist. Die Abbildung zeigt außerdem ein simuliertes Spektrum für eine Aminosäure mit einem Rotationswinkel $\rho = 235^\circ$ in einer α -Helix mit einem Tiltwinkel $\tau = 13^\circ$ und einem Ordnungsparameter $S = 0,8$ in ungeflippten Bizellen. Der Tiltwinkel τ und der Ordnungsparameter S stimmen mit den Werten überein, welche bereits für uniform markiertes TatA₂₋₄₅ bestimmt wurden. Man erkennt, dass das simulierte Spektrum recht gut mit dem experimentellen Spektrum übereinstimmt, wodurch der Rotationswinkel ρ_{Val15} der Aminosäure Val₁₅ auf 235° bestimmt werden konnte.

Aufgrund der Periodizität der α -Helix sind nun auch alle weiteren Signale des transmembranen PISA-*wheels* zugeordnet, wodurch nun prinzipiell für alle Aminosäuren in diesem Bereich ein Rotationswinkel angegeben werden kann. Definiert man nun den Rotationswinkel ρ der transmembranen Helix als den Rotationswinkel der ersten Aminosäure dieser Helix, so ergibt sich für $\rho_{\text{Pro8}} = \rho_{\text{TMHelix}} = 255^\circ$.

Zur Bestimmung des Rotationswinkels ρ der amphiphilen Helix und zur weiteren Verifizierung des Rotationswinkels der transmembranen Helix wurden weitere selektiv markierte Proben gemessen.

Die Abb. 71 zeigt das SAMMY-Spektrum von selektiv markiertem ^{15}N -Ile-TatA₂₋₄₅ in ungeflippten Bizellen überlagert mit einem simulierten Spektrum der entsprechenden Aminosäuren unter Berücksichtigung des mit Hilfe von uniform markiertem TatA₂₋₄₅ bestimmten Tiltwinkels τ und Ordnungsparameters S der beiden Helixsegmente.

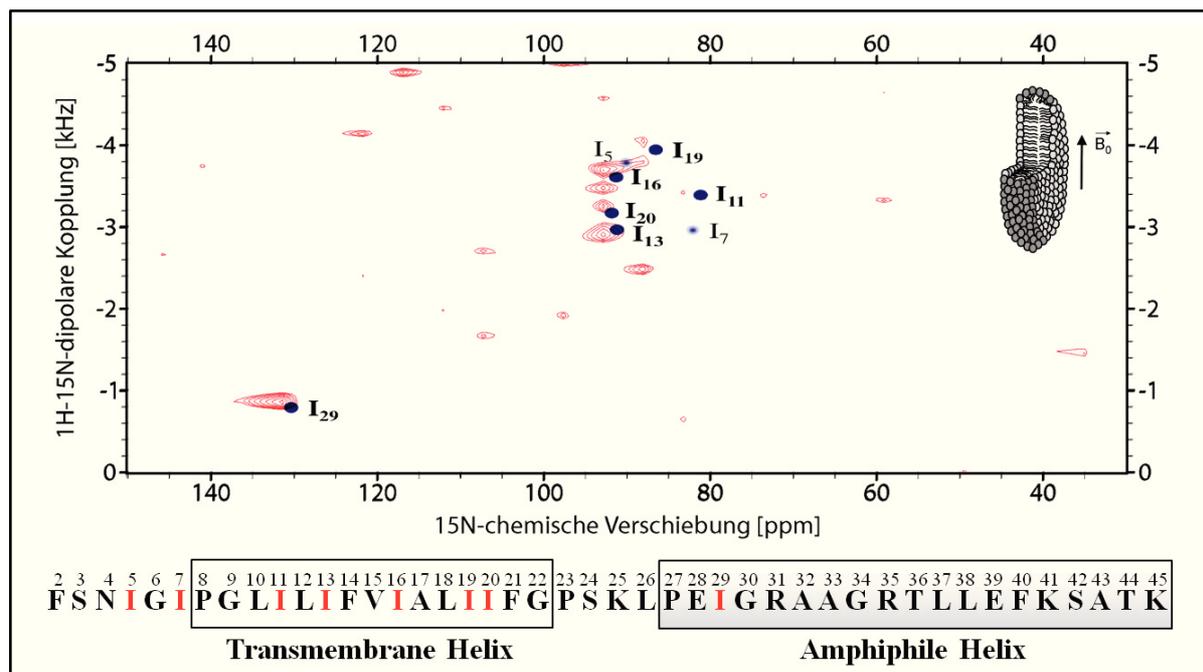


Abb. 71 **SAMMY-Spektrum von ^{15}N -Ile-TatA₂₋₄₅**

Überlagert mit einem simulierten Spektrum:

Transmembraner Bereich: $\tau = 13^\circ$; $S = 0,79$; $\rho_{\text{Ile}5} = 315^\circ$; $\rho_{\text{Ile}7} = 155^\circ$; $\rho_{\text{Ile}11} = 195^\circ$; $\rho_{\text{Ile}13} = 35^\circ$; $\rho_{\text{Ile}16} = 335^\circ$;
 $\rho_{\text{Ile}19} = 275^\circ$; $\rho_{\text{Ile}20} = 15^\circ$

Amphiphiler Bereich: $\tau = 64^\circ$; $S = 0,5$; $\rho_{\text{Ile}29} = 25^\circ$

(DMPC/DMPG 80:20; $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Bei Betrachtung der Aminosäuresequenz von TatA₂₋₄₅ erkennt man, dass sich ein Isoleucin im amphiphilen Teil des Proteins befindet. Dies ermöglicht die Bestimmung des Rotationswinkels ρ der amphiphilen Helix. Das simulierte Spektrum mit einem Rotationswinkel von $\rho_{\text{Ile}29} = 25^\circ$ ergibt eine sehr gute Übereinstimmung mit dem experimentell erhaltenen Spektrum. Definiert man nun Pro₂₇ als Beginn der amphiphilen Helix ergibt sich aufgrund der Periodizität der α -Helix für den Rotationswinkel der amphiphilen Helix $\rho_{\text{Pro}27} = \rho_{\text{APHelix}} = 185^\circ$.

Betrachtet man den transmembranen Bereich des Proteins, erkennt man, dass sich innerhalb der transmembranen Helix fünf Isoleucine befinden und außerdem noch zwei weitere direkt vor dieser Helix liegen. Die Simulation wurde für diese sieben Isoleucine basierend auf dem Rotationswinkel $\rho_{\text{Val}15}$ durchgeführt. Die simulierten Punkte für die beiden wahrscheinlich nicht mehr zur Helix gehörenden Isoleucine wurden aufgehellt dargestellt, wobei sie aber für die Simulation so behandelt wurden, als würden sie zu einer durchgehenden Helix gehören. Man erkennt, dass die simulierten Signale von Ile₁₃, Ile₂₀ und auch Ile₁₉ recht gut mit den experimentell erhaltenen Daten übereinstimmen. Für Ile₁₆ ist die Zuordnung des simulierten Datenpunkts nicht ganz eindeutig, da er genau zwischen zwei Signalen des experimentellen Spektrums liegt. Betrachtet man jedoch die Lage des simulierten Datenpunkts von Ile₅, so

erkennt man, dass dieser sehr gut zu einem der beiden Signale passen würde, welches auch für Ile₁₆ in Frage kommen könnte. Es zeigt sich ebenfalls, dass dieses Signal sehr breit im Vergleich zu den anderen Signalen ist, was vielleicht auf eine weniger starre Orientierung dieser Aminosäure schließen lässt. Somit wurde Ile₁₆ dem unteren Signal zugeordnet. Für Ile₁₁ ist nur ein sehr schwaches Signal zu erkennen, welches kaum stärker als das Rauschniveau ist. Es ist nicht abschließend zu klären, ob dieses Signal wirklich von Ile₁₁ stammt, oder warum es so schwach im Vergleich zu den anderen Signalen ist. Der simulierte Datenpunkt von Ile₇ stimmt mit keinem experimentell erhaltenen Signal überein. Es ist jedoch noch ein weiteres recht starkes Signal vorhanden, welches noch nicht zugeordnet werden konnte. Dieses Signal entspricht im uniform markiertem Spektrum (vergleiche Abb. 68) dem etwas unterhalb des transmembranen PISA-*wheels* liegendem Signal. Es könnte also durchaus zu Ile₇ gehören, da sich diese Aminosäure direkt vor dem Helixbrecher Prolin befindet und somit wahrscheinlich eine leicht andere Orientierung einnimmt, als die direkt zur transmembranen Helix gehörenden Aminosäuren. Der simulierte Datenpunkt, welcher eine durchgängige Helix mit einem gleichbleibenden Tiltwinkel τ und Ordnungsparameter S zugrundelegt, liefert in diesem Fall kein passendes Ergebnis. Interessant ist jedoch, dass das simulierte Signal für Ile₅ wieder recht gut mit den experimentellen Daten passen würde. Vielleicht ist die transmembrane Helix doch länger als zunächst vermutet und nur an der Position des Pro₈ etwas geknickt. Dies kann aber anhand dieser Daten nicht abschließend geklärt werden.

Abb. 72 zeigt ein SAMMY-Spektrum von selektiv markiertem ¹⁵N-Phe-TatA₂₋₄₅ in ungeflippten Bizellen. Man kann deutlich erkennen, dass die simulierten Datenpunkte im transmembranen Bereich sehr gut mit dem erhaltenen Signal der beiden transmembranen Phenylalanine Phe₁₄ und Phe₂₁ übereinstimmen. Das experimentell erhaltene Signal ist nicht in zwei einzelne Signale aufgelöst, aber auch die Simulation zeigt, dass die beiden Signale sehr dicht beieinander liegen. Somit konnte erneut gezeigt werden, dass der zuvor bestimmte Rotationswinkel ρ der transmembranen α -Helix gut zu den neuen experimentellen Daten passt.

Das Protein TatA₂₋₄₅ besitzt neben den transmembranen Phenylalaninen mit Phe₄₀ auch eines in der amphiphilen Helix. Im Spektrum ist aber keine Signalintensität in diesem Bereich zu erkennen. Der simulierte Datenpunkt zeigt, wo man das Signal unter Berücksichtigung des zuvor mit Hilfe von Ile₂₉ bestimmten Rotationswinkels ρ und des bereits aus der uniform markierten Probe bekannten Tiltwinkels τ sowie Ordnungsparameters S erwarten würde.

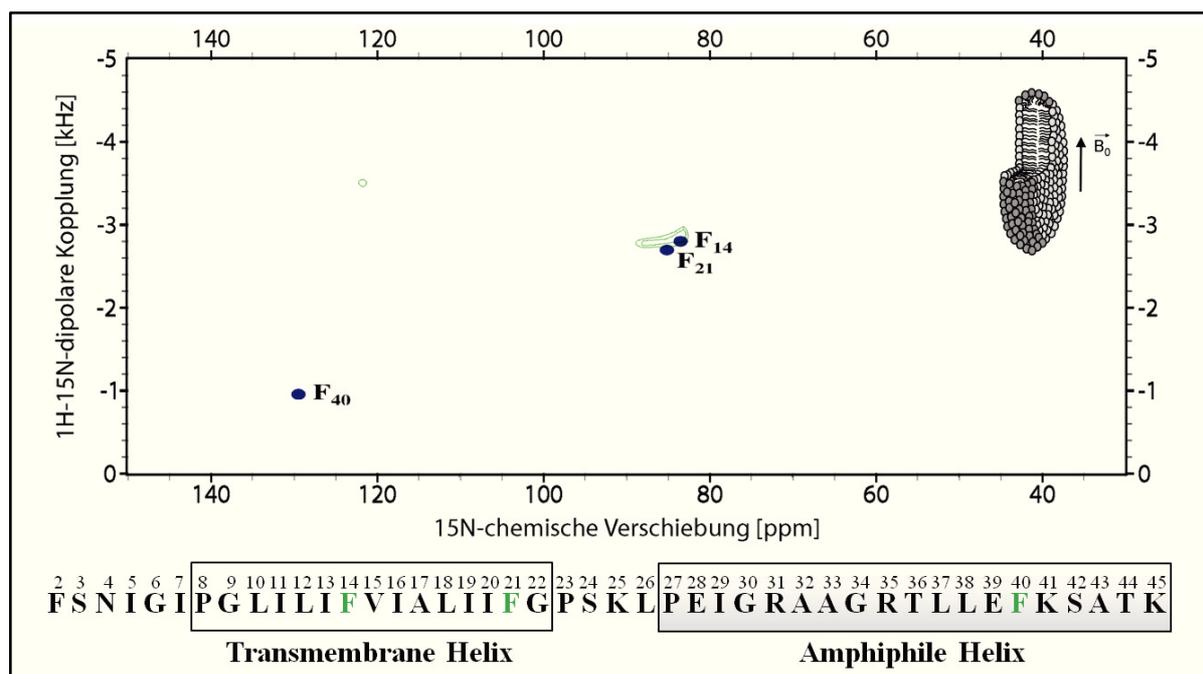


Abb. 72 SAMMY-Spektrum von ^{15}N -Phe-TatA₂₋₄₅

Überlagert mit einem simulierten Spektrum:

Transmembraner Bereich: $\tau = 13^\circ$; $S = 0,79$; $\rho_{\text{Phe14}} = 135^\circ$; $\rho_{\text{Phe21}} = 115^\circ$

Amphiphiler Bereich: $\tau = 64^\circ$; $S = 0,5$; $\rho_{\text{Phe40}} = 45^\circ$

(DMPC/DMPG 80:20; $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Die Signalintensität im amphiphilen Bereich ist, wie bereits in den 1D-Spektren zu erkennen war, bei ungeflippten Bizellen sehr viel geringer als im transmembranen Bereich. Außerdem ist dieser Bereich im Allgemeinen mit seinen kleinen dipolaren Kopplungen sehr viel stör anfälliger. Es kann aber nicht abschließend geklärt werden warum kein Signal für die Aminosäure Phe₄₀ beobachtet werden konnte.

Die folgenden selektiv markierten Proben, welche Signale im amphiphilen Bereich enthalten sollten, wurden sowohl in ungeflippten als auch in geflippten Bizellen gemessen.

In Abb. 73 ist das SAMMY-Spektrum von selektiv ^{15}N -Leucin markiertem TatA₂₋₄₅ sowohl in ungeflippten als auch in geflippten Bizellen gezeigt. Es sind neben drei Leucinen im transmembranen Bereich auch zwei Leucine im amphiphilen Bereich enthalten. Ein weiteres Leucin liegt direkt vor der amphiphilen Helix und wurde für die Simulation so behandelt, als würde es zu einer durchgängigen amphiphilen α -Helix gehören.

Die simulierten Datenpunkte für die transmembranen Leucine passen recht gut mit den erhaltenen Signalen überein. Bei genauerer Betrachtung stellt man fest, dass Leu₁₀ und insbesondere Leu₁₂ sowohl bei der ungeflippten als auch bei der geflippten Probe etwas weiter als Leu₁₈ von den simulierten Datenpunkten abweichen. Dies lässt sich vielleicht dadurch begründen, dass sich diese beiden Aminosäuren noch recht nah am Anfang der transmembranen α -Helix bzw. durch den vom Helixbrecher Pro₈ hervorgerufenen Knick

befinden und hier eine leicht andere Orientierung vorherrscht. Dies konnte, wie bereits zuvor diskutiert, ebenfalls für die Aminosäuren Ile₁₁, Ile₇ und Ile₅ beobachtet werden. Außerdem ist über dem Signal von Leu₁₂ noch ein weiteres Signal zu beobachten, welches jedoch bei der geflippten Probe nicht mehr auftrat. Es lässt sich nicht abschließend klären, ob es sich hierbei nur um Rauschen oder tatsächlich um eine andere Orientierung von Leu₁₂ handelt.

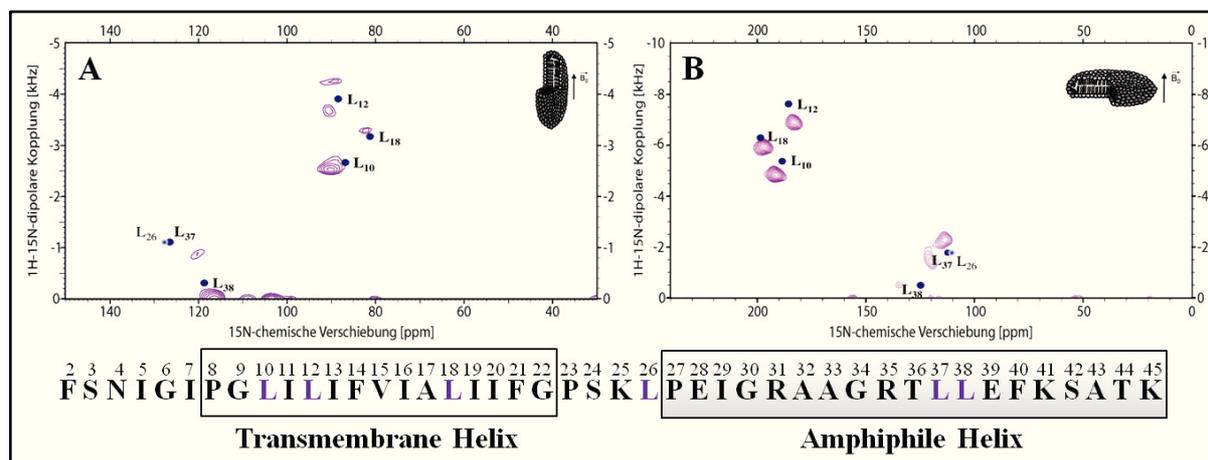


Abb. 73 SAMMY-Spektrum von ¹⁵N-Leu-TatA₂₋₄₅

A: SAMMY-Spektrum überlagert mit einem simulierten Spektrum in ungeflippten Bizellen und **B:** in geflippten Bizellen.

Transmembraner Bereich: $\tau = 13^\circ$, $S = 0,79$ (geflippt: $\tau = 12^\circ$; $S = 0,77$); $\rho_{\text{Leu}10} = 95^\circ$; $\rho_{\text{Leu}12} = 295^\circ$;
 $\rho_{\text{Leu}18} = 175^\circ$

Amphiphiler Bereich: $\tau = 64^\circ$, $S = 0,5$ (geflippt: $\tau = 64^\circ$; $S = 0,4$); $\rho_{\text{Leu}26} = 85^\circ$; $\rho_{\text{Leu}37} = 105^\circ$; $\rho_{\text{Leu}38} = 205^\circ$
 (DMPC/DMPG 80:20; $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Bei der Betrachtung der amphiphilen Helix erkennt man, dass im Fall der ungeflippten Probe der simulierte Datenpunkt für Leu₃₈ recht gut auf ein experimentelles Signal passen würde. Im Spektrum der geflippten Probe ist jedoch kein oder allerhöchstens ein sehr schwaches Signal zu beobachten. Bei Signalen im Bereich von 0 kHz dipolarer Kopplung ist jedoch immer mit Störungen zu rechnen, und somit lässt sich nicht abschließend beurteilen, ob es sich hierbei nur um Rauschen oder tatsächlich um das Signal von Leu₃₈ handelt.

Die simulierten Datenpunkte von Leu₂₆ und Leu₃₇ liegen unter der Annahme, dass Leu₂₆ noch zu einer durchgängigen amphiphilen α -Helix gehört, fast genau auf der gleichen Stelle (siehe aufgehellte dargestellter Datenpunkt von Leu₂₆). Es ist aus den erhaltenen Spektren nicht möglich, hier genauere Aussagen zu treffen, ob Leu₂₆ zu einer kurzen Loop-Region oder doch eher zur amphiphilen Helix gehört, welche zwischen den beiden Segmenten bzw. zwischen den beiden Helixbrechern Pro₂₃ und Pro₂₇ etwas aufgeweitet vorliegt.

Der simulierte Datenpunkt von Leu₃₇ (bzw. Leu₂₆) passt im Fall der ungeflippten Probe nicht sehr gut mit dem erhaltenen Signal zusammen, welches um ca. 6 ppm hochfeldverschoben vorliegt. Im Fall der geflippten Probe hingegen passt der simulierte Datenpunkt sehr viel

besser zum experimentell erhaltenen Signal. Die Simulation für die geflippte Probe wurde mit gleichem Tiltwinkel τ , jedoch mit kleinerem Ordnungsparameter $S = 0,4$ durchgeführt, da sich auch schon bei der uniform markierten Probe zeigte, dass der Ordnungsparameter im Fall der geflippten Probe etwas kleiner zu sein scheint. Es kann nicht abschließend geklärt werden, warum das Signal im Fall der ungeflippten Probe weniger gut passt.

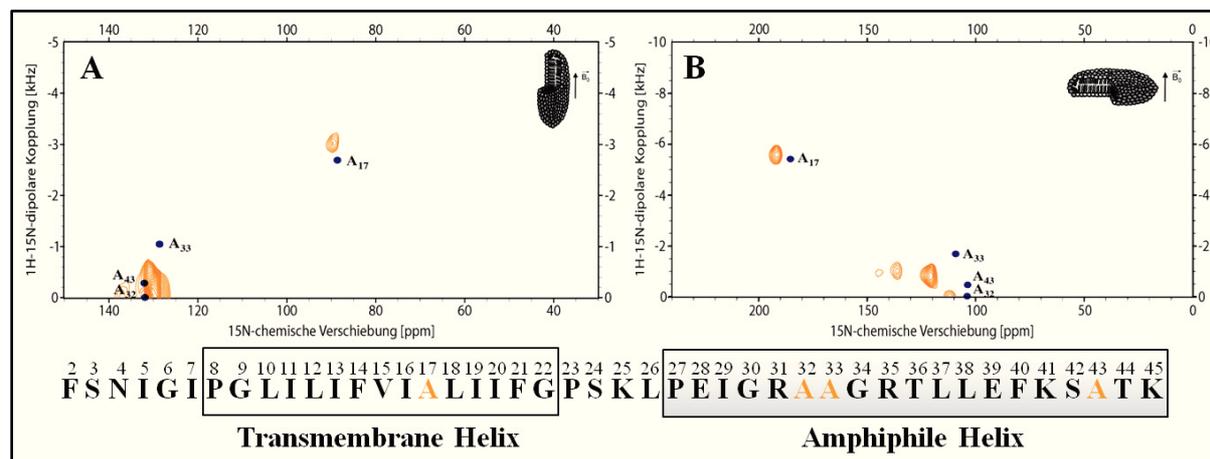


Abb. 74 SAMMY-Spektrum von ^{15}N -Ala-TatA₂₋₄₅

A: SAMMY-Spektrum überlagert mit einem simulierten Spektrum in ungeflippten Bizellen und **B:** in geflippten Bizellen.

Transmembraner Bereich: $\tau = 13^\circ$, $S = 0,79$ (geflippt: $\tau = 12^\circ$; $S = 0,77$); $\rho_{\text{Ala}17} = 75^\circ$

Amphiphiler Bereich: $\tau = 64^\circ$, $S = 0,5$ (geflippt: $\tau = 64^\circ$; $S = 0,4$); $\rho_{\text{Ala}32} = 325^\circ$; $\rho_{\text{Ala}33} = 65^\circ$; $\rho_{\text{Ala}43} = 345^\circ$
(DMPC/DMPG 80:20; $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Abb. 74 zeigt das SAMMY-Spektrum von selektiv ^{15}N -Alanin markiertem TatA₂₋₄₅ in ungeflippten und geflippten Bizellen. In der transmembranen α -Helix ist nur ein Alanin enthalten, welches im Spektrum zu einem Signal im transmembranen Bereich führt. Dieses Signal stimmt mit dem simulierten Datenpunkt sowohl in ungeflippten als auch in geflippten Bizellen überein. Es ist jedoch in beiden Fällen eine Abweichung zu erkennen, welche größer ist als die bisher im transmembranen Bereich bei den weiteren selektiv markierten Proben beobachteten Abweichungen. Es scheint also, dass Ala₁₇ eine leicht andere Orientierung als erwartet einnimmt.

Im amphiphilen Bereich liegen drei Alanine vor, wobei Ala₄₃ schon recht weit am Ende des Proteins liegt und somit wohl eine erhöhte Mobilität aufweisen sollte. In ungeflippten Bizellen ist nur ein sehr breites Signal zu erkennen, welches mit den simulierten Datenpunkten für Ala₃₂ und Ala₄₃ übereinstimmt. Der simulierte Datenpunkt von Ala₃₃ liegt etwas über diesem breitem Signal, wodurch nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch dieser ein Teil des Signals ist.

Im Fall der geflippten Bizellen passen die simulierten Datenpunkte nur sehr schlecht zu den experimentell erhaltenen Signalen. Es sind zwar drei gut aufgelöste Signale zu beobachten, welche auch das gleiche Signalmuster wie die berechneten Datenpunkten einnehmen, jedoch ist deren Lage deutlich tieffeldverschoben.

Die aus den SAMMY-Spektren gewonnenen Informationen ergeben jetzt ein recht gutes Bild der Orientierung von TatA₂₋₄₅ in der Membran. Aufgrund der Periodizität der α -Helix ist es nun auch möglich Signale von Aminosäuren zuzuordnen, für welche keine selektiv markierten Proben zur Verfügung standen.

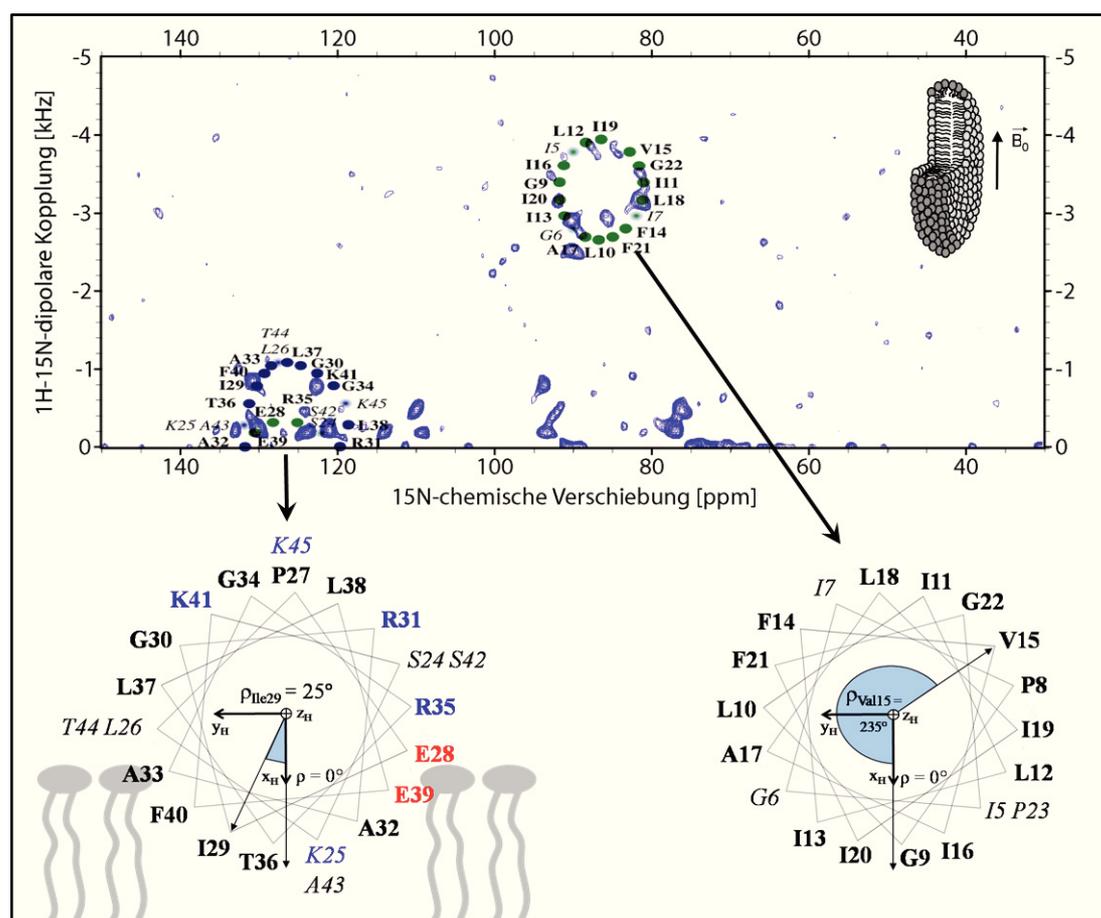


Abb. 75 **Darstellung der Orientierung der transmembranen und amphiphilen Helix anhand von *helical wheel plots* basierend auf dem aus SAMMY-Spektren bestimmten Rotationswinkel ρ**

SAMMY-Spektrum von uniform ^{15}N -markiertem TatA₂₋₄₅ in ungeflippten Bizellen überlagert mit simulierten PISA-*wheels* und Darstellung der Lage der Helixsegmente in der Membran anhand von *helical wheel plots*. Transmembraner Bereich: $\tau = 13^\circ$, $S = 0,79$, $\rho_{\text{Val15}} = 235^\circ$; Amphiphiler Bereich: $\tau = 64^\circ$, $S = 0,5$, $\rho_{\text{Ile29}} = 25^\circ$ (DMPC/DMPG 80:20; $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Die Abb. 75 zeigt ein SAMMY-Spektrum von uniform markiertem TatA₂₋₄₅ überlagert mit simulierten PISA-*wheels* für den transmembranen und den amphiphilen Bereich basierend auf dem bereits zuvor bestimmten Tiltwinkel τ und Ordnungsparameter S . Unter der Annahme

einer idealen α -Helix (100°-Schritte zwischen zweier benachbarter Aminosäuren) wurde ausgehend vom bereits bestimmten Rotationswinkel $\rho_{\text{Val15}} = 235^\circ$ für die transmembrane Helix bzw. $\rho_{\text{Ile29}} = 25^\circ$ für die amphiphile Helix die Signallage aller weiteren Aminosäuren der betreffenden Helix berechnet. Somit ist nun auch die Zuordnung von Signalen möglich, welche nicht anhand von Messungen an selektiven Proben bestimmt wurden. Die Aminosäuren, welche nicht sicher zu der jeweiligen Helix gehören, da sie am Beginn der Helix vor dem Helixbrecher Prolin liegen und somit vielleicht eine andere Orientierung einnehmen, sind aufgehellt dargestellt. (Die Simulationen wurden aber unter Annahme einer durchgängigen idealen α -Helix durchgeführt.) Ebenso sind in der amphiphilen Helix die Signale der drei letzten Aminosäuren aufgehellt dargestellt, da diese aufgrund der erhöhten Mobilität am C-Terminus bei dem Konstrukt TatA₂₋₄₅ vielleicht auch nicht mehr zu einer durchgängigen Helix gehören. Die simulierten Datenpunkte der amphiphilen Helix sind in zwei Farben dargestellt, um zu verdeutlichen, dass es bei diesem PISA-*wheel* zu einem Wechsel des Vorzeichens der dipolaren Kopplung kommt und somit ein Teil der Signale in das Spektrum hereingefaltet ist. Da in den Abbildungen nur der negative Teil des SAMMY-Spektrums gezeigt wird, ist die Abfolge der Aminosäuren im PISA-*wheel* entgegen dem Uhrzeigersinn. Bei dem hineingespiegelten Teil (Abb. 75 blaue Punkte) des amphiphilen PISA-*wheels* ist die Abfolge demnach im Uhrzeigersinn. Da die Aminosäure Prolin in einer Peptidbindung kein Amidproton besitzt und sich somit kein Signal im SAMMY-Spektrum ergibt, sind in den simulierten PISA-*wheels* auch keine Proline enthalten.

Die *helical wheel plots* zeigen die Orientierung der amphiphilen und transmembranen α -Helix basierend auf den aus den SAMMY-Spektren bestimmten Rotationswinkeln ρ . Die Aminosäuren, welche nicht sicher zur α -Helix gehören sind kursiv dargestellt. Zur besseren Verdeutlichung des Ladungsprofils der amphiphilen Helix sind negativ geladene Aminosäuren rot und positiv geladene Aminosäuren blau dargestellt. Außerdem ist die Lage der Membran durch einige Lipidmoleküle angedeutet. Bei einem *helical wheel plot* betrachtet man eine Helix entlang der Helixachse vom N- zum C-Terminus. Hierbei zeigt die Helixachse z_H in die Papierebene hinein, und unter Berücksichtigung der Definition des Rotationswinkels ρ (siehe Abb. 69) ergibt sich die Lage der Achse x_H , welche dem Rotationswinkel $\rho = 0$ entspricht.

Besonders auffallend ist, dass basierend auf dem bestimmten Rotationswinkel ρ nicht alle geladenen Reste der amphiphilen Helix in die wässrige Umgebung zu zeigen scheinen. So zeigt die Aminosäure Lys₂₅ recht deutlich in die hydrophobe Membran. Dies kann bei dieser

Aminosäure noch dadurch erklärt werden, dass sie sich am Anfang der amphiphilen Helix befindet (vor Helixbrecher Pro₂₇) und so wahrscheinlich doch eine etwas andere Orientierung einnimmt. Da für eine genauere Betrachtung die Lage der Helixseitenketten wichtig ist und diese nicht direkt aus dem *helical wheel plot* hervorgehen, wurde mit Hilfe des Programms pymol [200] ein 3D-Modell der amphiphilen Helix erstellt und so gedreht, dass es dem bestimmten Rotationswinkel ρ entspricht.

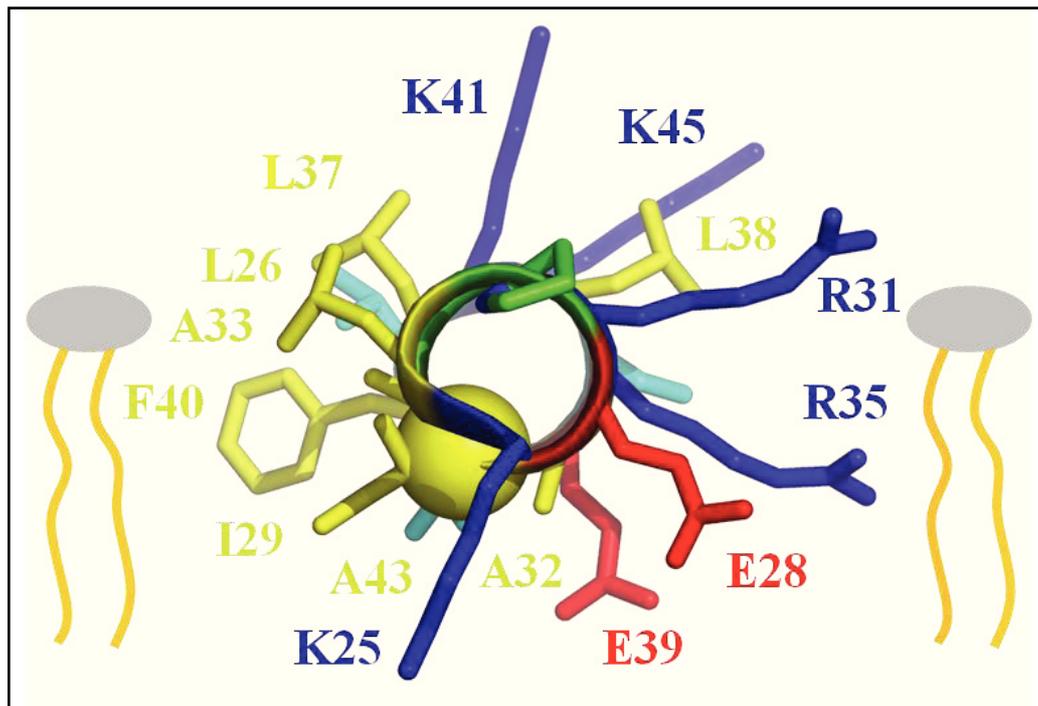


Abb. 76 **3D-Computermodell der amphiphilen α -Helix**

Computermodell der Sequenz S24-K45 unter der Annahme einer idealen α -Helix, dargestellt vom N- zum C-Terminus und unter Berücksichtigung des bestimmten Rotationswinkels ρ .
Blau: basische Aminosäuren; Rot: saure Aminosäuren; Gelb: hydrophobe Aminosäuren; Ball markiert Ile₂₉

In Abb. 76 erkennt man, dass auch die Aminosäuren Glu₂₈, Glu₃₉, Arg₃₅ neben dem bereits erwähnten Lys₂₅ mit ihren geladenen Seitenketten in Richtung der hydrophoben Membran zeigen. Dies könnte man zum einen dadurch erklären, dass diese geladenen Aminosäuren recht lange Seitenketten besitzen und somit je nach Eintauchtiefe der Helix auch in der Lage wären zu „schnorcheln“. Dies bedeutet, dass die Seitenketten in der Art orientiert werden, dass sie nach oben in Richtung wässriger Umgebung zeigen und mit den geladenen Phospholipidkopfgruppen interagieren. Aufgrund der negativen Ladung der Phospholipidkopfgruppen wäre dies jedoch nur für die positiv geladenen Seitenketten wie Lys₂₅ und Arg₃₅ denkbar. Eine weitere Möglichkeit, welche auch die Orientierung der negativ geladenen Seitenketten Glu₂₈ und Glu₃₉ erklären könnte, wäre die Ausbildung von intramolekularen Salzbrücken. Somit wäre aufgrund der vorliegenden Geometrie die

Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Arg₃₅-Glu₃₉ und ebenso zwischen Lys₂₅-Glu₂₈ bzw. Glu₂₈-Arg₃₁ denkbar.

Betrachtet man die hydrophoben Seitenketten, so erkennt man, dass Leu₃₇, Leu₃₈, Leu₂₆ und auch Ala₃₃ je nach Eintauchtiefe in die Membran nicht komplett in einer hydrophoben Umgebung liegen. Leu₂₆ liegt vor dem durch Pro₂₇ hervorgerufenen Knick in der Helix und kann sich wahrscheinlich so orientieren, dass seine Seitenkette in die Membran zeigt. Auch die Seitenketten der Aminosäuren Leu₃₇ und Ala₃₃ können sich wahrscheinlich in einer Art orientieren, dass sie in die Membran eintauchen. Die Seitenkette von Leu₃₈ hat jedoch keine Möglichkeit in eine hydrophobe Umgebung einzutauchen. Aufgrund der außergewöhnlichen Lage von Leu₃₈ kann man vielleicht auf eine besondere Funktion dieser Aminosäure im Protein TatA_d schließen. Es ist denkbar, dass diese Seitenkette beim Zusammenlagern mehrerer Monomere wichtig ist, oder vielleicht in einer Pore eine hydrophobe Barriere ausbildet.

Auch der Fehler bei der Bestimmung des Rotationswinkels ρ muss natürlich bei der Betrachtung der Lage der amphiphilen Helix berücksichtigt werden. Da die Qualität der zur Verfügung stehenden Daten bei der amphiphilen Helix viel schlechter und auch die Anzahl der zum Fit zur Verfügung stehenden Signale aus den selektiv markierten Proben viel geringer als bei der transmembranen Helix war, wird auch der Fehler entsprechend größer abgeschätzt. Bei der transmembranen Helix wird der Fehler des Rotationswinkels ρ auf $\pm 20^\circ$ geschätzt, da die Breite der Signale keine genauere Bestimmung zulässt. Der Fehler des Rotationswinkels der amphiphilen Helix wird aufgrund der zuvor genannten Schwierigkeiten auf $\pm 50^\circ$ abgeschätzt.

Die 2D-Festkörper NMR Messungen haben somit ein 3D-Strukturmodell von TatA₂₋₄₅ in der Membran ergeben. So konnte der Tiltwinkel der transmembranen Helix auf $13^\circ \pm 4^\circ$ und der amphiphilen Helix auf $64^\circ \pm 10^\circ$ bestimmt werden. Auch die Beweglichkeit konnte durch den Ordnungsparameter S charakterisiert werden, wodurch sich für die transmembrane Helix ein Wert von $S = 0,8 \pm 0,03$ und für die amphiphile Helix von $S = 0,5 \pm 0,15$ ergab. Die Bestimmung des Rotationswinkels erlaubte die Charakterisierung der Drehung der Helix in der Membran und wurde für die transmembrane Helix auf $\rho_{\text{Val15}} = 235^\circ \pm 20^\circ$ und für die amphiphile Helix auf $\rho_{\text{Ile29}} = 25^\circ \pm 50^\circ$ bestimmt.

4.3.4 2D-NMR Messung an TatA₂₂₋₄₅ in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen

Das Fragment TatA₂₂₋₄₅ besteht nur aus der amphiphilen Helix des Proteins TatA_d. Es ist deshalb sehr gut geeignet, um den Einfluss der transmembranen Helix auf die Orientierung der amphiphilen Helix zu bestimmen.

Im Gegensatz zu den bisherigen Messungen wurden die Proben mit TatA₂₂₋₄₅ nicht in Bizellen, sondern in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen rekonstituiert. Da das Protein TatA₂₂₋₄₅ keinen Membrananker in Form einer transmembranen Helix besitzt, könnte sich dieses Fragment in Bizellen-Proben auch an die, von dem kurzkettigen Lipid 6-O-PC gebildeten, Randflächen der Bizellen anordnen und somit hier eine falsche Orientierung vorspiegeln. Eine transmembrane Orientierung wäre dann nicht von der Möglichkeit, dass das Molekül flach auf den Randflächen der Bizellen aufliegt, unterscheidbar. Um diese Mehrdeutigkeiten zu vermeiden, wurden die Messungen in Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen vorgenommen.

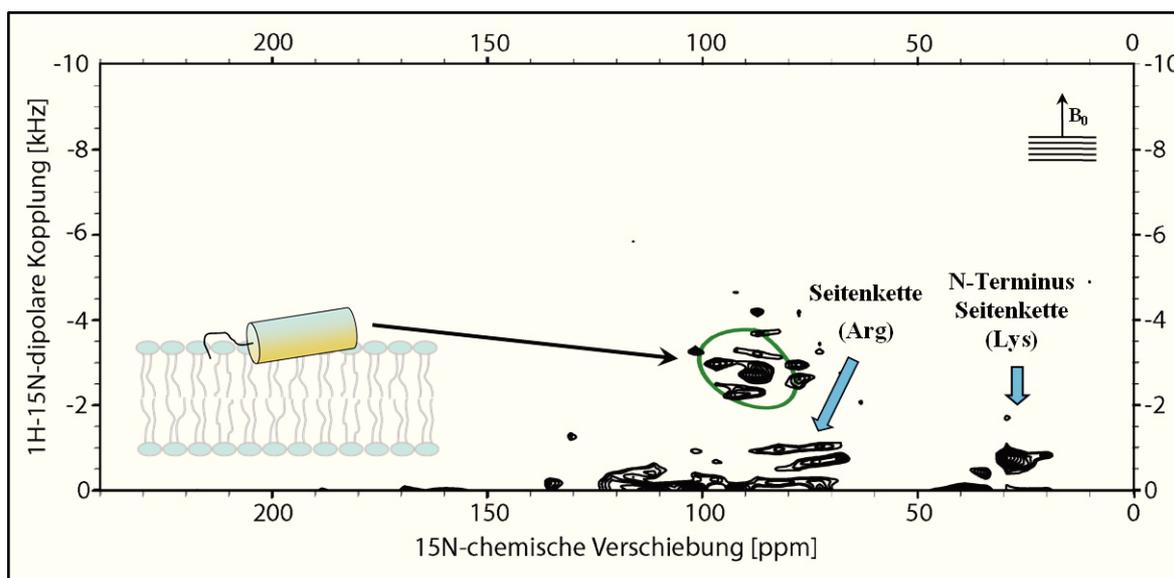


Abb. 77 ¹⁵N-TatA₂₂₋₄₅ in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen

Überlagert mit einem simulierten Spektrum: $\tau = 81^\circ$; $S = 0,75$
(DMPC/DMPG 30:70; P:L = 1:25; $T = 315$ K)

Abb. 77 zeigt das SAMMY-Spektrum von TatA₂₂₋₄₅ in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen. Diese sind mit ihrer Membrannormalen parallel zum Magnetfeld ausgerichtet, und ihre Orientierung entspricht demnach den geflippten Bizellen. Man erkennt deutlich die Signalintensität im amphiphilen Bereich des Spektrums. Außerdem sind bei ca. 35 ppm chemischer Verschiebung die Signale des N-Terminus und der Lysin-

Seitenketten zu erkennen (vergleiche Tabelle in Abb. 60). Die Signale im Bereich von 75 ppm chemischer Verschiebung und 0 - 1 kHz dipolarer Kopplung sind demnach den Arginin Seitenketten des Proteins TatA₂₂₋₄₅ zuzuordnen. Die verbliebenen Signale bilden ein PISA-*wheel*, welches zwar nicht so gut wie die bisher gezeigten PISA-*wheels* von TatA₂₋₄₅ aufgelöst ist, aber dennoch eine Abschätzung des Tiltwinkels zulässt. Das gezeigte simulierte Spektrum wurde für einen Tiltwinkel von $\tau = 81^\circ$ und einem Ordnungsparameter $S = 0,75$ erstellt und zeigt eine recht gute Überlappung mit der gemessenen Signalverteilung. Unter Berücksichtigung des abgeschätzten Fehlers ergibt sich eine Orientierung von TatA₂₂₋₄₅ zu $\tau = 81^\circ \pm 5^\circ$ und $S = 0,75 \pm 0,1$.

Die Orientierung der amphiphilen Helix ohne den Transmembrananker scheint sich demnach recht deutlich von der in TatA₂₋₄₅ zu unterscheiden. Die amphiphile Helix alleine nimmt eine fast waagerechte Position auf der Membran ein, wohingegen diese in TatA₂₋₄₅ eine starke Schräglage aufzeigt. Die transmembrane Helix von TatA₂₋₄₅ ist recht kurz und kann nur sehr schwer die gesamte Membran durchspannen, wodurch anscheinend die amphiphile Helix in die Membran gezogen wird und es somit zu der festgestellten, starken Schräglage kommt.

Diesen Einfluss der transmembranen auf die amphiphile Helix konnte, wenn auch weniger deutlich, ebenfalls für das Fragment TatA₂₂₋₇₀ festgestellt werden, welches aus der amphiphilen Helix und dem C-Terminus besteht. Dieses nimmt in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen einen Tiltwinkel von $\tau = 75^\circ$ ein [156].

Dieser Unterschied der Orientierung der amphiphilen Helix war mit Hilfe der CD-Spektroskopie noch nicht zu erkennen, was zeigt, dass die Festkörper-NMR wichtige neue Daten zur Struktur von TatA_d hervorgebracht hat, welche die mehr qualitativen Aussagen der CD-Spektroskopie sinnvoll ergänzen. Diese Schräglage der Helix könnte möglicherweise einen wichtigen Einfluss auf die Ausbildung oder Funktion der Pore haben.

4.3.5 Untersuchung des Einflusses verschiedener

Umgebungsfaktoren auf die Orientierung von TatA₂₋₄₅

Es wurde überprüft welchen Einfluss verschiedene Parameter auf die Rekonstitution des Proteins TatA₂₋₄₅ in Bizellen haben. Es sollte zum einen der Einfluss auf die Qualität der Rekonstitution, und zum anderen eine eventuelle strukturelle Änderung des Proteins erfasst werden.

Das Protein TatA₂₋₄₅ kommt im Laufe der Aufreinigung mehrmals mit dem Detergenz NLS in Kontakt (vergleiche Abb. 44). Dieses Detergenz wird zwar durch ausgiebige Dialyseschritte wieder entfernt, aber wie anhand von analytischen HPLC-Untersuchungen festgestellt wurde, erfolgt dies nicht quantitativ. Es wurde daher versucht den Einfluss dieses Detergenzes abzuschätzen, indem Proben mit steigendem NLS-Gehalt erstellt wurden. Es wurden sowohl entsprechende 1D-¹⁵N-NMR-Spektren zur Untersuchung des Einflusses auf das Protein als auch ³¹P-NMR-Spektren zur Untersuchung der Bizellen durchgeführt. Das Detergenz könnte nämlich auch als kurzkettige Lipidkomponente wirken, und somit das q-Verhältnis der Bizellen beeinflussen.

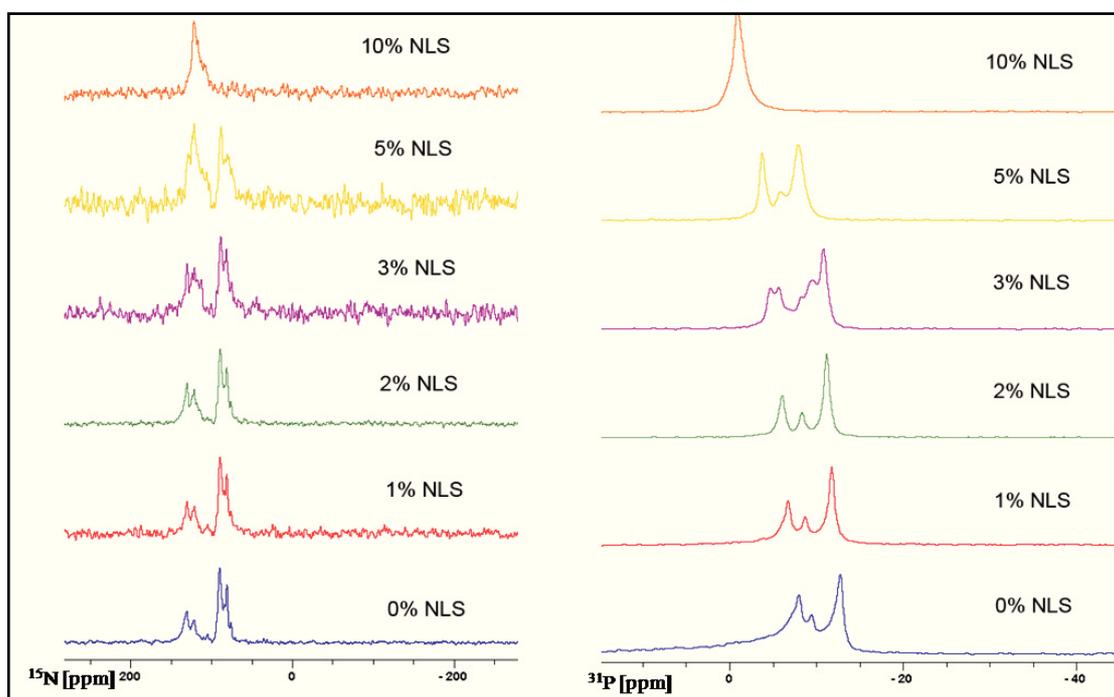


Abb. 78 Einfluss des Detergenz NLS auf die Orientierung von TatA₂₋₄₅
 1D-¹⁵N-NMR-Spektren und ³¹P-NMR-Spektren von uniform ¹⁵N-markiertem TatA₂₋₄₅ in ungeflipped Bizellen.
 NLS-Konzentration in Gewichtsprozent zur Lipidmasse.
 (DMPC/DMPG 80:20; q = 3,2; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

Die Abb. 78 zeigt, dass das Detergenz NLS erst bei sehr hohen Konzentrationen Einfluss auf die Orientierung des Proteins und der Bizellen nimmt. Bei Betrachtung der ³¹P-NMR-

Spektren fällt sogar auf, dass die Orientierung der Bizellen bei 1% NLS besser als ohne NLS zu sein scheint. Dies kann jedoch auch dadurch begründet sein, dass die Bizellen sich durch das erneute Mischen nach Zugabe von NLS besser ausgebildet haben. Sowohl das Protein als auch die Bizellen scheinen bis zu einer NLS-Konzentration von 2% sehr gut orientiert zu sein. Ab einer Konzentration von 3% NLS beginnen die Bizellen langsam zu zerfallen, und auch das 1D- ^{15}N -NMR-Spektrum des Proteins zeigt ein zunehmendes isotropes Signal bei 120 ppm. Bei einer Konzentration von 10% NLS sind die Bizellen zerstört, und das ^{31}P -NMR-Spektrum zeigt ein isotropes Signal bei 0 ppm. Auch das 1D- ^{15}N -NMR-Spektrum lässt auf keine Orientierung des Proteins mehr schließen und zeigt ein isotropes Signal bei 120 ppm.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass die sich nach der Aufreinigung im Protein befindlichen Mengen an NLS zu keiner Änderung der Struktur des Proteins führen.

Der Tat-abhängige Transport ist ATP-unabhängig und die protonenmotorische Kraft über der Membran wird als treibende Kraft des Transports angenommen [7, 87]. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob bei einer Änderung des pH-Wertes strukturelle Änderungen an TatA₂₋₄₅ auftreten.

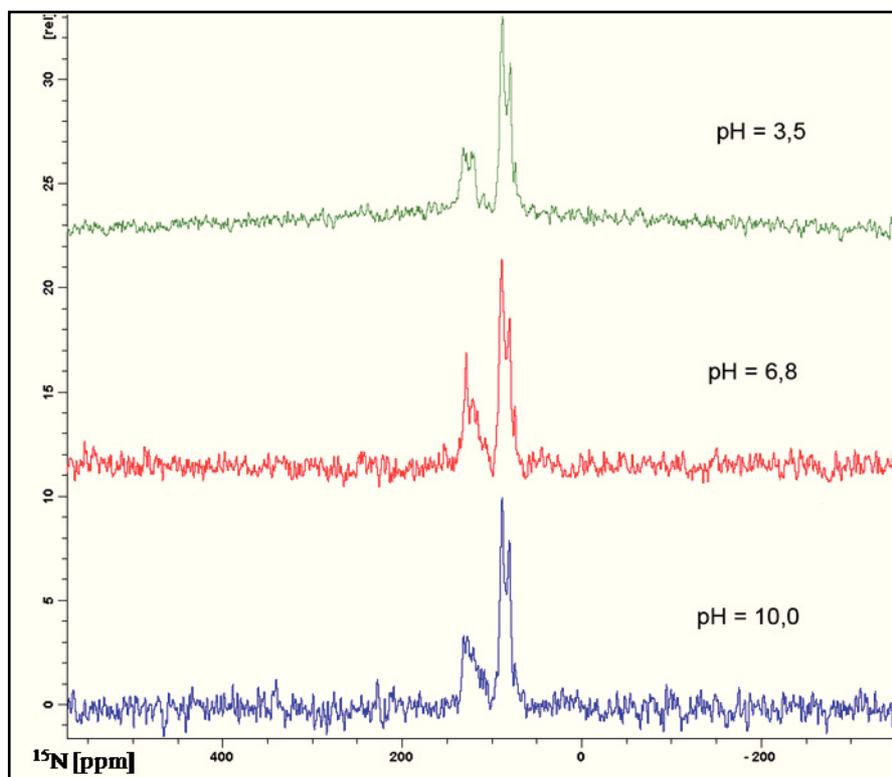


Abb. 79 **Einfluss des pH-Wertes auf die Orientierung von TatA₂₋₄₅**
 1D- ^{15}N -NMR-Spektren von uniform ^{15}N -markiertem TatA₂₋₄₅ in ungeflippten Bizellen.
 (DMPC/DMPG 80:20; $q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; T = 315 K)

Das 1D- ^{15}N -NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ zeigt keine sofort auffallenden Änderungen bei den untersuchten pH-Werten 3,5; 6,8 und 10 (siehe Abb. 79). Bei genauerer Betrachtung sind leichte Änderungen in der Intensität der amphiphilen Helix zu erkennen. Hier kann ein gewisser Einfluss des pH-Werts nicht ausgeschlossen werden, und um diesen Sachverhalt zu klären, wären weitere 2D-Festkörper-NMR Messungen erforderlich. Es sind jedoch nur sehr schwache Änderungen, und eine globale Modifikation der Struktur müsste sich durch deutlichere Unterschiede bereits im 1D-Spektrum zeigen. Der pH-Wert scheint also zumindest in Bizellen, in welchen das Protein aufgrund des begrenzten Platzangebots nicht als Oligomer vorliegen kann, keinen großen Einfluss auf die Struktur von TatA₂₋₄₅ zu besitzen.

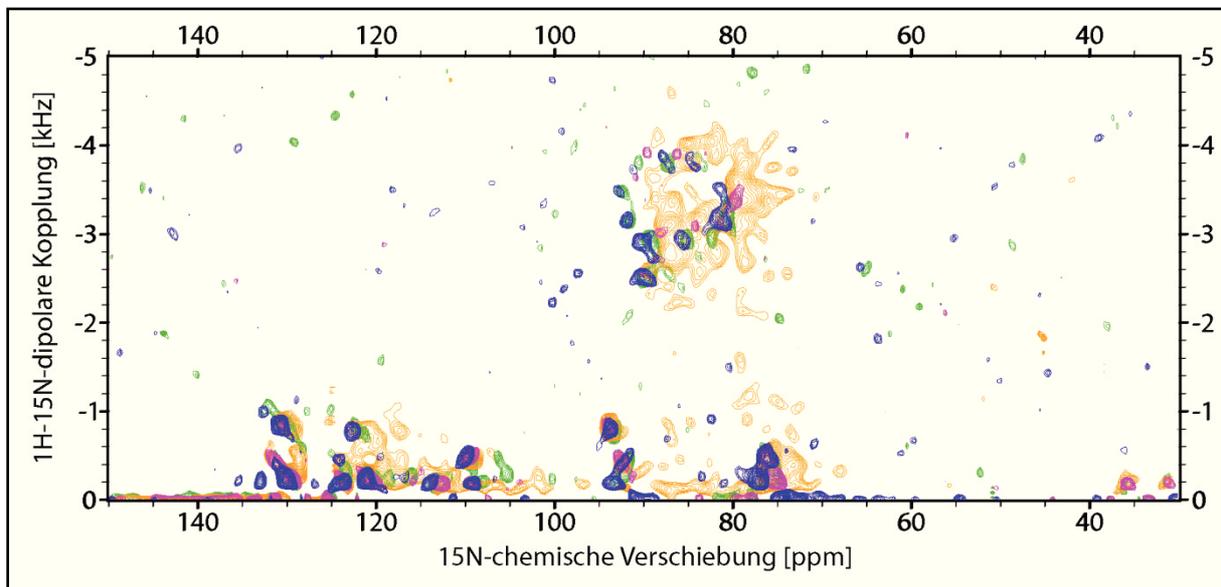


Abb. 80 Einfluss der Temperatur auf das SAMMY-Spektrum von ^{15}N -TatA₂₋₄₅
 SAMMY-Spektrum von uniform ^{15}N -markiertem TatA₂₋₄₅ in ungeflippten Bizellen bei folgenden Temperaturen:
 Grün: 318 K; Blau: 315 K; Pink: 310 K und Orange: 305 K
 (DMPC/DMPG 80:20; q = 3,2; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8)

Das SAMMY-Spektrum in Abb. 80 zeigt uniform ^{15}N -markiertes TatA₂₋₄₅ bei unterschiedlichen Temperaturen, um einen möglichen Einfluss auf die Orientierung des Proteins aufzuzeigen. Generell muss erwähnt werden, dass die Messungen nur in dem Temperaturbereich durchgeführt werden können, in welchem sich Bizellen ausbilden (vergleiche Abb. 56). Man erkennt, dass sich die Spektren von TatA₂₋₄₅, welche bei den Temperaturen 318 K (grün), 315 K (blau) und 310 K (pink) gemessen wurden, sehr gut überlagern. Dies zeigt auch die hohe Reproduzierbarkeit der Messungen. Nur das Spektrum bei 305 K (orange) zeigt eine deutlich verschlechterte Auflösung und auch eine leichte Orientierungsänderung der transmembranen Helix. Wahrscheinlich sind bei dieser

Temperatur die Bizellen noch nicht so gut orientiert, was zu der verschlechterten Auflösung führt. Die Temperatur von 315 K, bei der alle Messungen durchgeführt wurden, liegt also in der Mitte des geeigneten Temperaturbereiches. Auch eine geringe Aufheizung der Probe während des Experimentes kann noch ohne Einfluss auf die Orientierung toleriert werden.

Es wurde auch der Einfluss unterschiedlicher Lipidsysteme auf die Orientierung des Proteins untersucht, indem das Protein in den Bizellensystemen rekonstituiert und anschließend ein NMR-Spektrum aufgenommen wurde. So konnte bereits zuvor nachgewiesen werden, dass das Protein TatA₂₋₄₅ keine negativ geladenen Lipide zur Rekonstitution benötigt und somit auch in DMPC/6-O-PC-Bizellen die gleiche Orientierung wie in den standardmäßig verwendeten, sauren DMPC/DMPG/6-O-PC Bizellen (DMPC/DMPG 80:20) einnimmt (vergleiche Abb. 59 und Abb. 61).

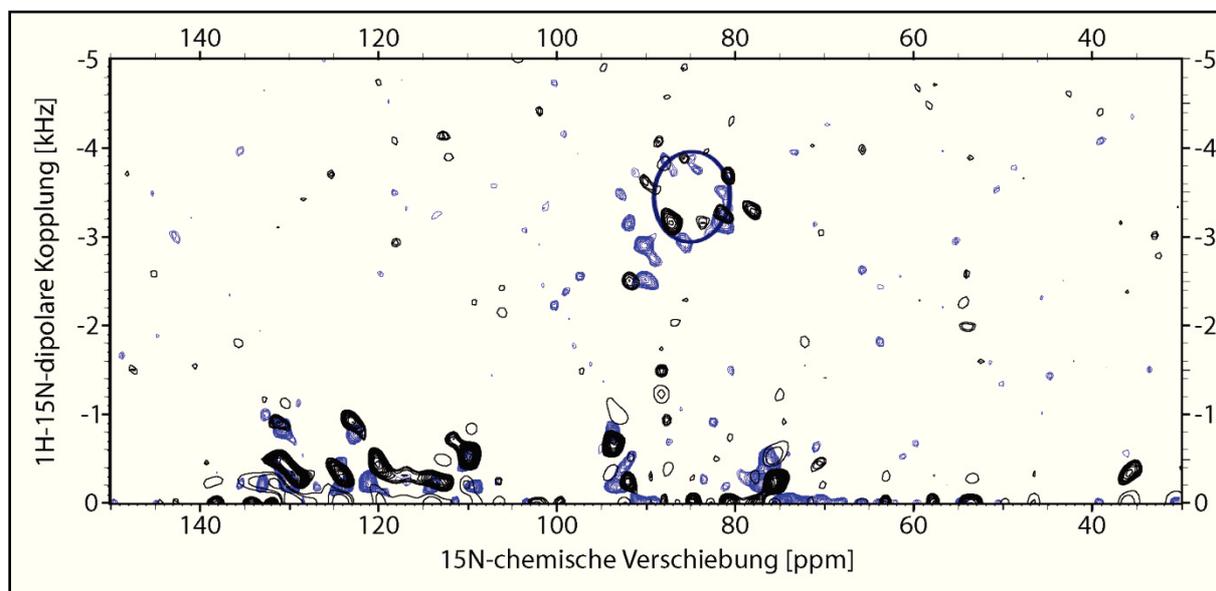


Abb. 81 **Einfluss unterschiedlicher Lipidsysteme auf das SAMMY-Spektrum von ¹⁵N-TatA₂₋₄₅**

SAMMY-Spektrum von uniform ¹⁵N-markiertem TatA₂₋₄₅ in ungeflippten Bizellen unterschiedlicher Lipidsysteme: **Blau:** DMPC/DMPG (80:20), 6-O-PC; **Schwarz:** DMPC, DPC
 Simuliertes Spektrum: $\tau = 10^\circ$ $S = 0,8$
 ($q = 3,2$; 22 % Gesamtlipidmenge; P:L = 1:100; pH = 6,8; T = 315 K)

In dem hier gezeigten Spektrum (siehe Abb. 81) wurde nun kein langkettiges Lipid, sondern das kurz-kettige Lipid 6-O-PC durch DPC ersetzt. Somit entstand eine neue Art von Bizellen, welche in der Literatur noch nicht bekannt sind. Bisher sind als kurz-kettige Lipide für den Einsatz in Bizellen vor allem DHPC und sein etherverknüpftes Analogon 6-O-PC üblich, wohingegen für die langkettigen Lipide eine weitaus größere Auswahl zur Verfügung steht. Somit ist nun auch in dieser Hinsicht eine größere Vielfalt gegeben, und da DPC auch oft in der Aufreinigung von Membranproteinen als Detergenz Anwendung findet, könnte das

Protein direkt aus diesem in die Bizellen rekonstituiert werden. Hiermit könnte man sich den normalerweise notwendigen Detergenzaustausch ersparen, welcher gerade für Membranproteine immer die Gefahr der Denaturierung birgt.

Diese neuen Bizellen konnten im Magnetfeld orientiert werden, und ein SAMMY-Spektrum von uniform ^{15}N -markiertem TatA₂₋₄₅ (schwarzes Spektrum) zeigte für die transmembrane Helix eine leicht andere Orientierung als für das in DMPC/DMPG/6-O-PC-Bizellen (DMPC/DMPG 80:20) rekonstituierte Protein (blaues Spektrum). Auf die Signalverteilung der amphiphilen Helix, welche flach auf der Membran aufliegt, scheint das neue Bizellensystem keinen Einfluss zu besitzen. Das simulierte Spektrum für den transmembranen Bereich wurde für einen Tiltwinkel von $\tau = 10^\circ$ und einem Ordnungsparameter von $S = 0,8$ berechnet, wodurch sich zeigt, dass die Orientierung in dem neuen Bizellensystem noch im Bereich des zuvor bestimmten Fehlers von $\tau = 13^\circ \pm 4^\circ$ und $S = 0,8 \pm 0,03$ liegt.

Die Orientierung von TatA₂₋₄₅ scheint also auch in anderen Modellmembranen nahezu konstant zu bleiben, wodurch die biologische Relevanz der Messungen bestätigt werden konnte.

4.4 Flüssigkeits-NMR Messungen

Die Flüssigkeits-NMR Spektroskopie stellt eine komplementäre Methode zur Festkörper-NMR Spektroskopie dar. Sie kann über skalare Kopplungen, isotrope chemische Verschiebungen und NOE-Signalen sehr genaue Aussagen über die lokale Struktur eines Proteins treffen. Mit Hilfe von dipolaren Restkopplungen (*residual dipolar couplings*, RDCs), welche an partiell orientierten, gelösten Molekülen gemessen werden, kann sogar die globale Struktur aufgeklärt werden. Die Festkörper-NMR Spektroskopie hingegen kann die Orientierung des Proteins in der Membran direkt bestimmen, wodurch sich die beiden Methoden sehr gut ergänzen.

Um die Flüssigkeits-NMR Experimente auch auf unlösliche, hydrophobe Proteine anwenden zu können, muss das Protein in einer geeigneten Umgebung rekonstituiert werden. Hierzu eignen sich insbesondere Detergenz-Mizellen [201] oder isotrope Bizellen mit kleinem q [202]. Nicht jedes Membranprotein kann jedoch erfolgreich mit Hilfe der Flüssigkeits-NMR Spektroskopie vermessen werden, da mit zunehmender Proteingröße die Linienbreite erheblich ansteigt. Deshalb konnten beispielsweise bisher auch noch keine hochaufgelösten Spektren von TatC mit seinen sechs transmembranen Helices erzielt werden [64].

4.4.1 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC Spektroskopie

Das *Heteronuclear Single Quantum Correlation* (HSQC)-Spektrum ist ein wichtiges Basisexperiment bei der Strukturaufklärung von Proteinen. Es verknüpft die ^1H -chemische Verschiebung mit der ^{15}N -chemischen Verschiebung. Aufgrund der Unempfindlichkeit des ^{15}N -Kernes nutzt das HSQC ein inverses heteronukleares Messverfahren. Hierbei werden zuerst die Protonen magnetisiert, und mit einem ersten INEPT-Schritt (*Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer*) wird diese Magnetisierung auf das über ^1J -Kopplung direkt verbundene, unempfindliche ^{15}N übertragen. In der darauffolgenden inkrementierten t_1 -Zeit kann sich die Magnetisierung entwickeln (Protonenkopplung und chemische Verschiebung werden durch einen 180° -Puls in der Mitte der t_1 -Zeit unterdrückt). Anschließend wird die Magnetisierung durch einen inversen INEPT-Schritt wieder zurück auf die Protonen übertragen und das Signal unter Stickstoffbreitbandenkopplung detektiert. Das Spektrum besteht also aus einem ^1H -Spektrum auf der x-Achse und einem breitbandenkoppelten ^{15}N -Spektrum auf der y-Achse. Somit ergibt das HSQC-Spektrum eines Proteins für jede Aminosäure außer Prolin ein Signal, welches durch das Amid-NH in

der Peptidbindung hervorgerufen wird. Auch die Seitenketten von Proteinen, welche ein N-H besitzen, ergeben entsprechende Signale.

Ein HSQC-Spektrum stellt eine Art Fingerabdruck eines Proteins dar, und es lässt bereits Rückschlüsse auf die richtige Faltung zu, da aggregierte Proteine zu Linienverbreiterung und somit zu starker Signalüberlagerung führen. Mit diesem recht einfachen Experiment lässt sich also recht schnell die Qualität (richtige Faltung) und bei vorhandenen Vergleichsspektren auch die Identität der Probe abschätzen. Außerdem kann der Erfolg der ^{15}N -Markierung während der Biosynthese überprüft werden. Des Weiteren können mit Hilfe von HSQC-Spektren schnell Ligandenbindungsstellen identifiziert werden, indem der Ligand zum untersuchenden Protein titriert wird. Hierbei kommt es bei Signalen von Aminosäuren, welche mit dem Liganden wechselwirken, aufgrund des Einflusses des Liganden zu einer Signalverschiebung. Das HSQC-Spektrum ist zwar ein recht einfaches Experiment, aber es kann bereits aus diesem ersten Experiment eine Fülle an Information gewonnen werden.

- **HSQC-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in SDS-Mizellen**

Das Konstrukt TatA₂₋₄₅ wurde in deuterierten SDS-Mizellen (450 mM) in einem Phosphat-Puffer (pH = 6,0) erfolgreich rekonstituiert und ein HSQC-Spektrum aufgenommen.

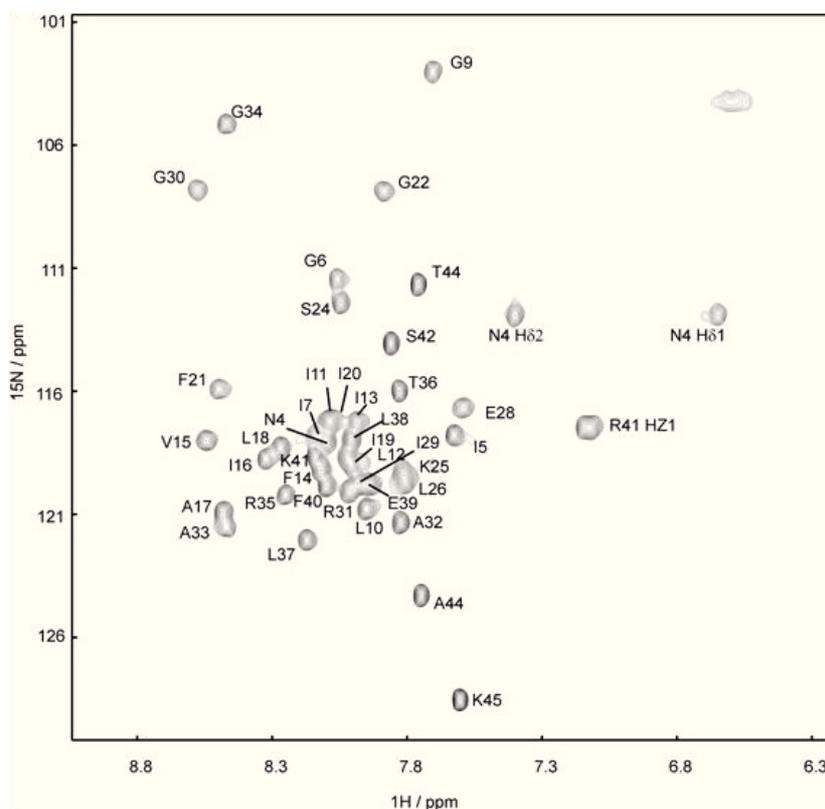


Abb. 82 ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{15}N -TatA₂₋₄₅ in SDS-Mizellen
1 mM ^{15}N -TatA₂₋₄₅; 450 mM SDS-d₂₅; 50 mM NaP_i; pH = 6.0; T = 323 K

Das ^{15}N -HSQC-Spektrum von TatA₂₋₄₅ ist gut aufgelöst und zeigt anhand der spektralen Dispersion und der Linienbreite, dass das Protein erfolgreich rekonstituiert werden konnte und gefaltet vorliegt (siehe Abb. 82). Die komplette Zuordnung des Spektrums konnte in Verbindung mit weiteren ^1H , ^{15}N , ^{13}C -Triple-Resonanzexperimenten (HNCOCACB und HNCACB) an einer uniform ^{15}N - ^{13}C -markierten Probe in Zusammenarbeit mit Dr. Claudia Muhle-Goll (KIT Karlsruhe) erreicht werden.

Das Protein konnte ebenfalls in DPC-Mizellen oder in SDS-Mizellen in Citrat-Puffer (pH = 4,0) erfolgreich rekonstituiert werden. Die dabei beobachtete leichte Verschiebung der Signale war nicht auf eine strukturelle Änderung zurückzuführen, sondern resultierte aus der anderen chemischen Umgebung der Kerne in DPC-Bizellen bzw. einem anderen pH-Wert. Dies konnte ebenfalls mit CD-Messungen und Festkörper-NMR Messungen (vergleiche Abb. 79) bei unterschiedlichen pH-Werten bestätigt werden, welche ebenfalls keine Änderung zeigten.

- **HSQC-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in isotropen Bizellen**

Wie bereits zuvor erwähnt orientieren sich Bizellen ab einem q-Faktor $\leq 1,5$ nicht mehr im Magnetfeld. Diese isotropen Bizellen können somit in der Flüssigkeits-NMR als Modellmembransystem Anwendung finden und sie erlauben das Protein in einer Lipidumgebung zu untersuchen. Sie stellen somit ein gutes Analogon zu den in der Festkörper-NMR verwendeten Bizellen mit $q \geq 2,5$ dar.

TatA₂₋₄₅ konnte erfolgreich in diesen isotropen Bizellen rekonstituiert werden (siehe Abb. 83). Das Spektrum des Proteins in SDS-Mizellen (schwarzes Spektrum) unterscheidet sich leicht vom Spektrum in isotropen Bizellen (rotes Spektrum). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich wieder um keine strukturellen Änderungen, sondern die Verschiebung der Signale beruht auf der unterschiedlichen chemischen Umgebung der Kerne in isotropen Bizellen und SDS-Mizellen. Beide Spektren zeigen eine gute Auflösung und spektrale Dispersion, was darauf schließen lässt, dass das Protein in beiden Fällen gefaltet ist.

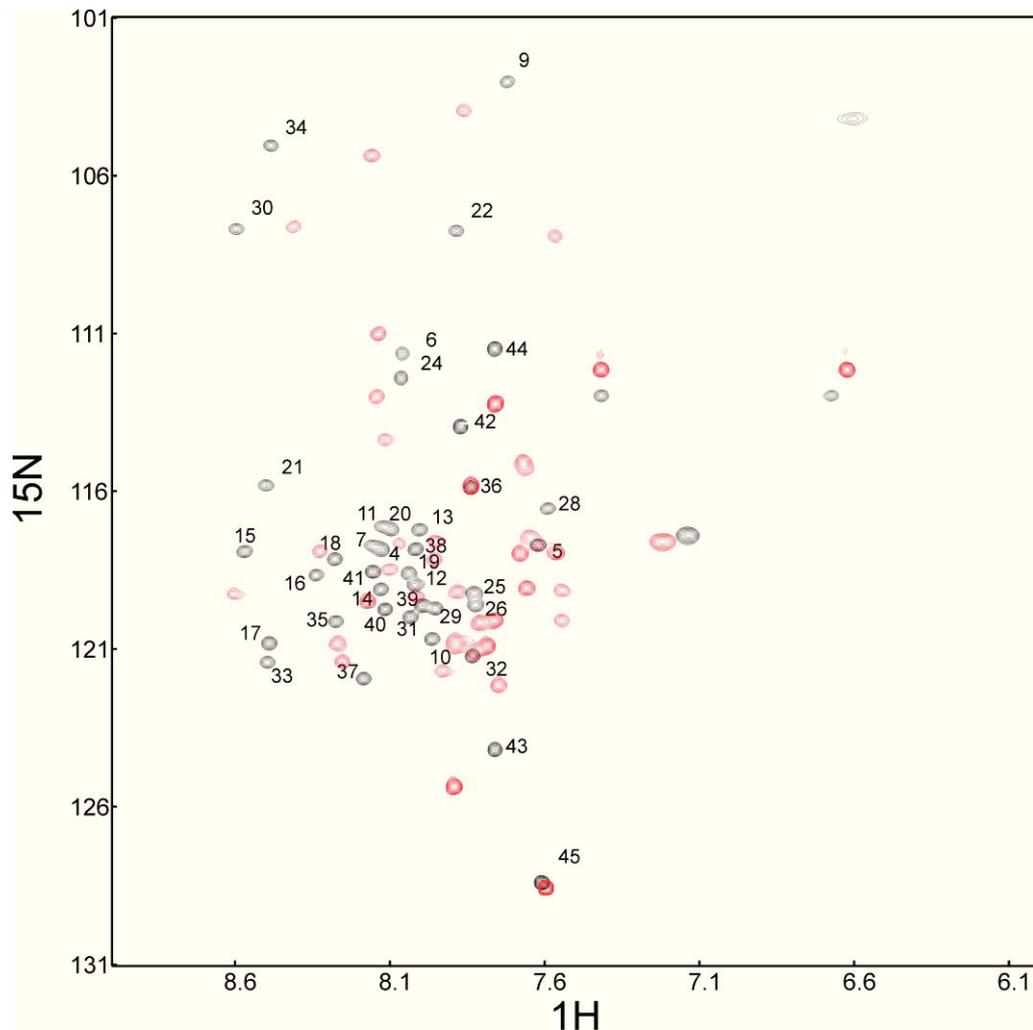


Abb. 83 ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{15}N -TatA₂₋₄₅ in isotropen Bizellen
 Rot: 0,5 mM TatA₂₋₄₅; DMPC-d54/DHPC-bicelles; $q = 0,25$; 50 mM NaPi; pH = 6.0; T = 308K
 Schwarz: 1 mM TatA₂₋₄₅; 450 mM SDS-d25; 50 mM NaPi; pH = 6.0; T = 323K

- **H₂O/D₂O-Austauschexperimente zur Bestimmung der Länge der transmembranen Region**

H₂O/D₂O-Austauschexperimente stellen eine allgemeine Methode zur Bestimmung der Länge von transmembranen Segmenten von Proteinen dar [203]. Amid-Protonen, die zugänglich für das deuterierte Lösungsmittel sind, werden gegen Deuteronen ausgetauscht und verschwinden somit im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum. Das Transmembransegment des Proteins hingegen ist durch die SDS-Mizelle gegen Austausch geschützt und somit bleiben diese Signale erhalten.

Das folgende Experiment (siehe Abb. 84) wurde zeitaufgelöst durchgeführt um auch noch Protonen in der Zwischenphase der SDS-Mizelle zu erkennen, welche zwar nach einiger Zeit ausgetauscht werden, aber im Vergleich zu den frei zugänglichen Protonen viel langsamer austauschen.

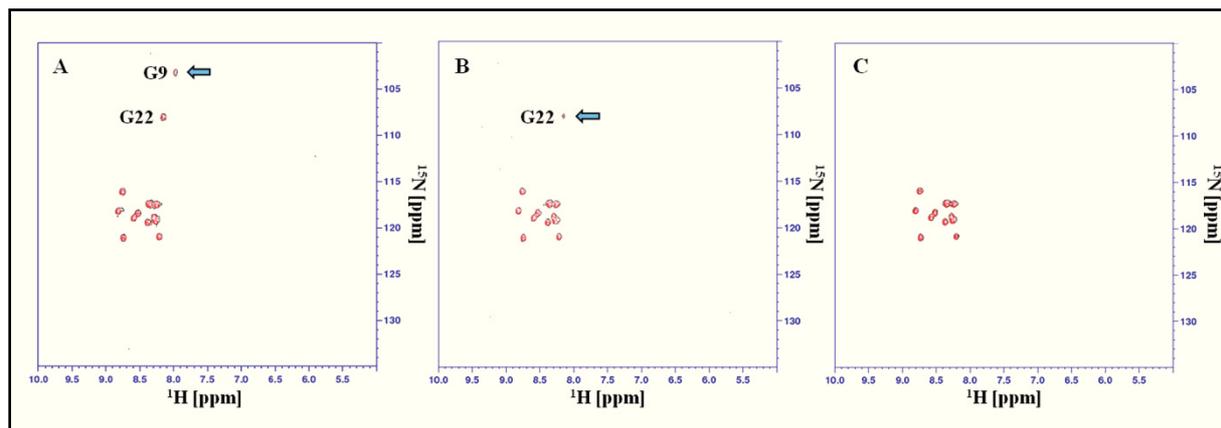


Abb. 84 **D₂O/H₂O-Austauschexperiment an TatA₂₋₄₅ in SDS-Mizellen**

A: 15 min, **B:** 45 min und **C:** 75 min nach D₂O-Zugabe.

(1mM ¹⁵N-TatA₂₋₄₅; 450 mM SDS-d₂₅; 50 mM NaP_i; pH = 6.0; T = 323 K)

Zur Durchführung des H₂O/D₂O-Austausches wird die Probe zuerst in wässriger Umgebung dargestellt und ein HSQC-Spektrum gemessen, um die richtige Faltung des Proteins sicherzustellen. Anschließend wird die Probe lyophilisiert und nach Zugabe von reinem D₂O möglichst schnell ein HSQC-Spektrum aufgenommen (ca. 30 min Aufnahmedauer). 15 min nach D₂O-Zugabe zeigte die Probe noch die Signale von Gly₉ bis Gly₂₂. Nach weiteren 30 min verschwand jedoch zuerst das Gly₉-Signal und 75 min nach D₂O-Zugabe ist auch das Gly₂₂-Signal verschwunden. Die restlichen Signale tauschen auch nach mehreren Wochen nicht aus. Dies zeigt, dass sowohl Gly₉ als auch Gly₂₂ am Rand der SDS-Mizelle liegen, wohingegen Leu₁₀ bis Phe₂₁ fest in der SDS-Mizelle eingeschlossen sind.

Die Festkörper-NMR Ergebnisse legen eine etwas längere transmembrane Helix nahe, da im transmembranen Bereich des Spektrums von selektiv ¹⁵N-Ile markiertem TatA₂₋₄₅ zwei Signale auftreten, die Ile₇ und Ile₅ zugeordnet werden könnten (vergleiche Abb. 71). Dieser Unterschied lässt sich vielleicht damit begründen, dass die SDS-Mizellen durch ihre stark gekrümmte Oberfläche nur ein relativ schlechtes Membranmodell darstellen. Somit erscheint das transmembrane Segment vielleicht etwas kürzer, da es von der SDS-Mizelle nicht vollständig umschlossen werden kann. Aus diesem Grund wurde der D₂O-Austausch nochmals in isotropen Mizellen durchgeführt. In diesem Fall war jedoch ein zeitaufgelöster H₂O/D₂O-Austausch nicht möglich, da aufgrund der schlechteren Signalstärke eine zu lange Messzeit benötigt wurde, weshalb die Signale von Gly₉ und Gly₂₂ nicht aufgelöst werden konnten. Das Spektrum zeigte somit auch keine längere transmembrane Helix, was darauf hindeutet, dass auch in isotropen Mizellen das Transmembransegment nicht vollständig umschlossen werden kann und die isotropen Mizellen in ihrer Form eher einer Mizelle ähneln.

- **Qualitätskontrolle der selektiv markierten Proben mittels HSQC**

Das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum eignet sich auch hervorragend um die biosynthetisch hergestellten, selektiv markierten Proben (siehe Abb. 70-74) auf erfolgreiche ^{15}N -Markierung zu überprüfen.

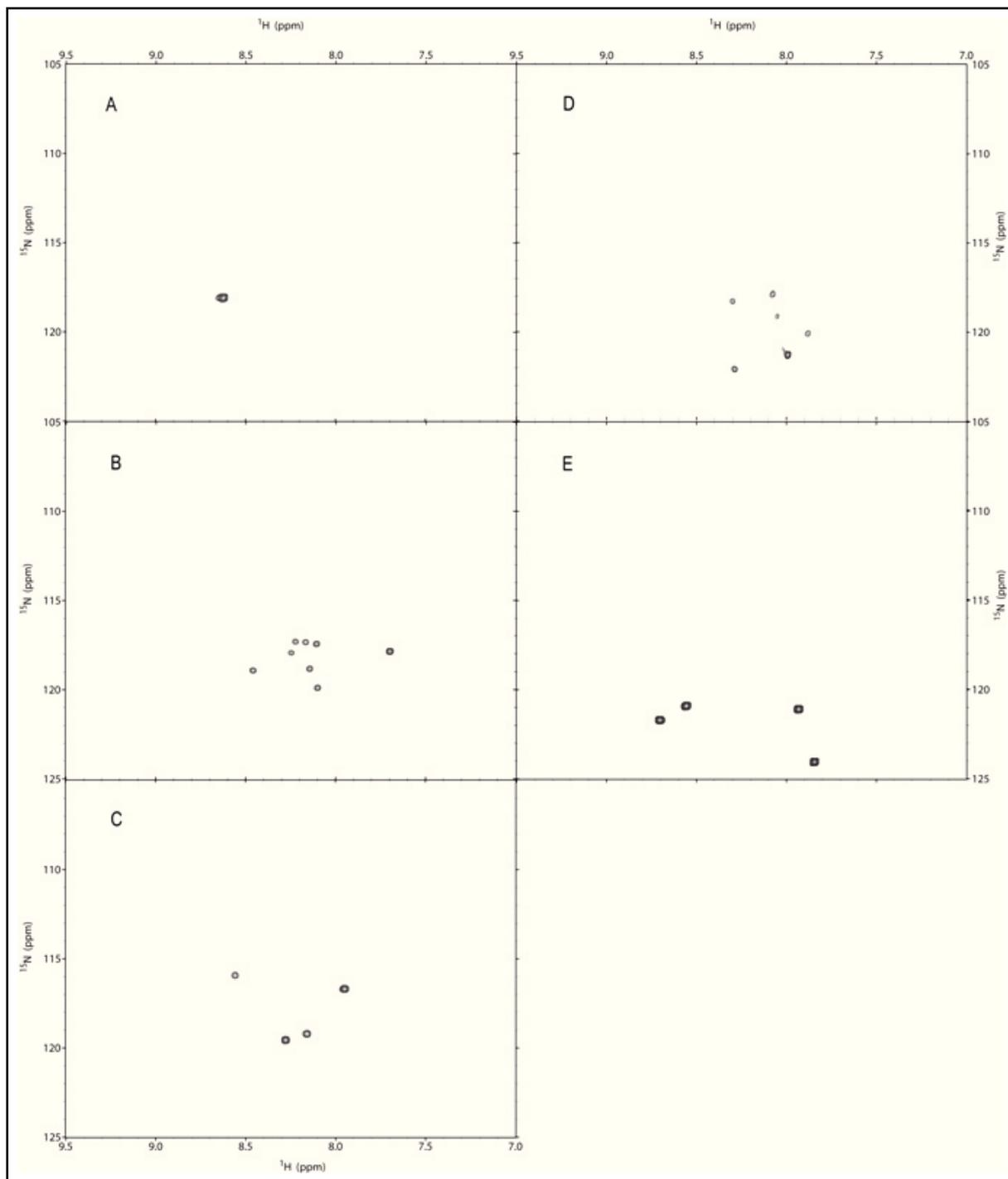


Abb. 85 ^{15}N -HSQC der selektiv ^{15}N -markierten Proben

A: ^{15}N -Val-TatA₂₋₄₅; **B:** ^{15}N -Ile-TatA₂₋₄₅; **C:** ^{15}N -Phe-TatA₂₋₄₅; **D:** ^{15}N -Leu-TatA₂₋₄₅; **E:** ^{15}N -Ala-TatA₂₋₄₅
 (1mM ^{15}N -TatA₂₋₄₅; 450 mM SDS-d25; 50 mM NaP_i; pH = 6.0; T = 323 K)

Abbildung übernommen aus [156].

Die HSQC-Spektren der selektiv markierten Proben zeigen, dass die Markierungen erfolgreich verlaufen sind (siehe Abb. 85). Die Anzahl der Signale entspricht jeweils der Anzahl der markierten Aminosäuren im Protein. Es konnte somit gezeigt werden, dass kein *Scrambling* auftrat.

- **Wechselwirkung zwischen TatA₂₋₄₅ und der Signalsequenz**

Wie bereits erwähnt, ist das HSQC-Spektrum auch sehr gut geeignet, um Wechselwirkungen zwischen einem Liganden und seiner Bindungsstelle im Protein zu untersuchen. Für TatA_d wurde eine hohe Affinität zu seinem Signalpeptid vorhergesagt [118], weshalb hier untersucht werden sollte, ob auch mittels NMR-Spektroskopie diese Wechselwirkung beobachtet werden kann und ob es möglich ist, die Aminosäuren zu identifizieren, welche an der Bindung beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde zu ¹⁵N-markierten TatA₂₋₄₅ ein synthetisch hergestelltes unmarkiertes Fragment des Signalpeptids titriert, welches die charakteristische Doppelarginin-Signalsequenz enthält. Im resultierenden HSQC-Spektrum konnte jedoch keine Signalverschiebung und somit auch keine Wechselwirkung beobachtet werden. Auch ein weiteres Experiment, in welchem unmarkiertes TatA_d zu biosynthetisch hergestelltem ¹⁵N-markiertem Signalpeptid titriert wurde, zeigte keine Signalverschiebung im Spektrum des Signalpeptids und somit ebenfalls keine Wechselwirkung.

Ein Grund für das Ausbleiben der Wechselwirkung könnte die Abschirmung durch die negativ geladenen SDS-Mizellen darstellen, in welchen das Protein und das Signalpeptid eingebettet waren. Weiterhin könnte die hohe Ionenstärke der NMR-Probe die Wechselwirkung gestört haben. Auf der anderen Seite besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass es entgegen der Ergebnisse von Pop et al. [118] keine Wechselwirkung zwischen TatA_d und seinem Signalpeptid gibt, da auch für den Tat-abhängigen Transport in *E. coli* nicht Tata sondern TatC als Bindungspartner für das Signalpeptid bestimmt wurde [76, 82, 83].

Es kann aber nicht abschließend geklärt werden, ob eine Affinität zwischen TatA_d und dem Tat-abhängigen Signalpeptid besteht.

4.4.2 NOESY-Spektren

Durch ¹⁵N- und ¹³C-NOESY Messungen an TatA₂₋₄₅ sollte die lokale Struktur von TatA₂₋₄₅ bestimmt werden. Diese Messungen wurden hauptsächlich von Dr. Claudia Muhle-Goll (KIT Karlsruhe) durchgeführt und sollen in dieser Arbeit kurz dargestellt werden, da sie einen komplementären Blick zu den Aussagen der Festkörper-NMR ermöglichen.

Im Gegensatz zu den skalaren Kopplungen, welche in den bisher beschriebenen Flüssigkeits-NMR Messungen Anwendung fanden, werden die in diesem Experiment beobachteten Wechselwirkungen zwischen Kerndipolen nicht über Bindungselektronen, sondern direkt über den Raum übertragen. Somit kann es auch zu Kopplungen zwischen Atomen kommen, welche über viele Bindungen entfernt sind, sich aber räumlich sehr nahe sind (bis zu 5 Å). Diese Wechselwirkung bewirkt der Kern Overhauser Effekt (*Nuclear Overhauser Effect*; NOE), welcher eine Übertragung von Magnetisierung zwischen räumlich benachbarten Kernen durch Kreuzrelaxation ermöglicht. Die geringe Reichweite dieser Wechselwirkung kann durch ihre Proportionalität zu $1/r^6$ begründet werden, wobei r der Abstand zwischen den beiden Kernen ist. Aus den gemessenen NOE-Intensitäten können Abstände gewonnen werden, was dieses Experiment für die Strukturaufklärung sehr wichtig macht. Aus einem Satz dieser Abstände kann mit Hilfe einer MD-Simulation die lokale Struktur berechnet werden. Man unterteilt die erhaltenen NOEs aufgrund ihrer Reichweite in *short-range*, *medium-range* und *long-range* NOEs. Die *short-range* NOEs dienen bei der Zuordnung von Signalen zur Bestimmung der Aminosäureabfolge des Proteins (Primärstruktur). Die *medium-range* NOEs hingegen dienen zur Bestimmung der Sekundärstruktur (Entfernung bis ca. 4 Aminosäuren). Am bedeutendsten sind jedoch die *long-range* NOEs, da sie Aussagen über die Tertiärstruktur des Proteins zulassen.

Im NOESY-Spektrum von TatA₂₋₄₅ konnten solche *long-range* NOEs nur zwischen Leu₁₈ und Pro₂₃ beobachtet werden (siehe Abb. 86).

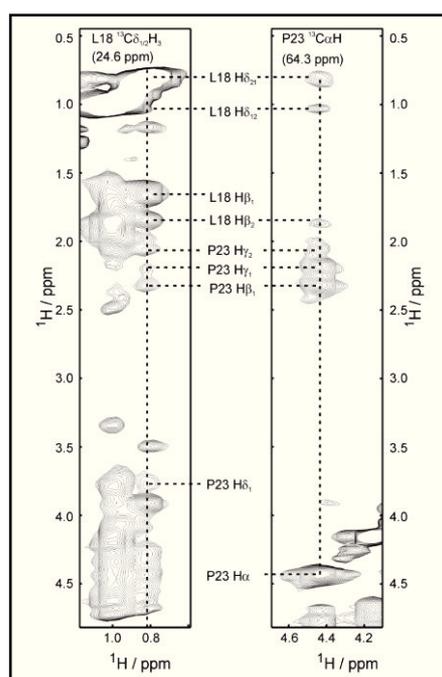


Abb. 86 *Long-range* NOEs von TatA₂₋₄₅ zwischen Leu₁₈ und Pro₂₃

Aus diesen und allen weiteren NOE-Signalen und den daraus gewonnenen Abstandsrandbedingungen konnte eine 3D-Struktur von TatA₂₋₄₅ berechnet werden (siehe Abb. 87).

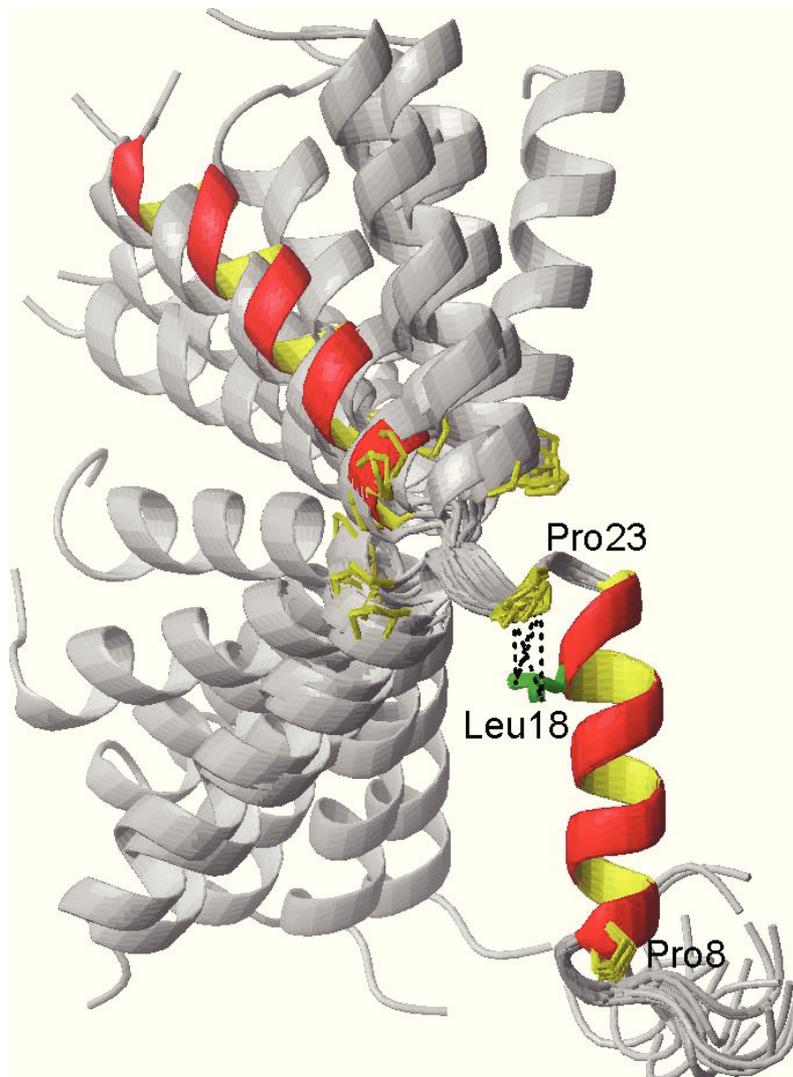


Abb. 87 Flüssigkeits-NMR Struktur von TatA₂₋₄₅

Die Flüssigkeits-NMR Struktur von TatA₂₋₄₅ ist als eine Überlagerung der 20 energetisch günstigsten Strukturen, welche durch die Strukturberechnung mit den Abstandsrandbedingungen erhalten wurden, dargestellt. Die Strukturen wurden alle auf die transmembrane Helix überlagert sind, wodurch sich die Orientierungen der amphiphilen Helix auffächern. Dieser Vielzahl der möglichen Orientierungen kann nun entweder eine wahre Flexibilität des Moleküls zu Grunde liegen, oder es sind nicht genügend Abstandsrandbedingungen vorhanden, welche die Tertiärstruktur definieren und somit eine Flexibilität nur vortäuschen.

Wie bereits erwähnt, sind die Flüssigkeits-NMR und die Festkörper-NMR Experimente komplementär zueinander. Die Flüssigkeits-NMR kann die lokale Molekülstruktur bestimmen, und die Festkörper NMR besitzt die einzigartige Möglichkeit, die Orientierung in der Membran zu bestimmen.

Die erhoffte weitere Einschränkung der aus der Festkörper-NMR bestimmten möglichen Orientierungen von TatA₂₋₄₅ in der Membran durch die Ergebnisse der Flüssigkeits-NMR konnte durch das weitgehende Fehlen von *long-range* NOEs nicht erfüllt werden. Diese Unterbestimmtheit führte zu der beobachteten Auffächerung der Struktur, wodurch die Festkörper-NMR Struktur nicht weiter eingeschränkt werden konnte.

5 Diskussion

Die Lage der transmembranen und der amphiphilen Helix in der Membran konnte mit Hilfe der Festkörper-NMR bestimmt werden. Die Kombination dieser beiden Orientierungen ergibt die Gesamtorientierung des Proteins TatA₂₋₄₅ im membrangebundenen Zustand. Durch die Inversionssymmetrie der Tensoren ergibt sich jedoch eine Doppeldeutigkeit, wobei die Orientierung einer Helix mit den Wertepaaren $[\tau, \rho]$ nicht unterscheidbar von der Orientierung mit den Wertepaaren $[180 - \tau, 180 + \rho]$ ist [204]. Anschaulich bedeutet dies, dass nach Festlegung der Orientierungsrichtung der transmembranen Helix durch die Lage des N-Terminus in der Membran und somit der Definition der Membranober- und -unterseite, der C-Terminus der amphiphilen Helix entweder in die Membran oder die wässrige Phase weisen kann. Für eine amphiphile Helix können diese beiden Orientierungsmöglichkeiten in der Regel aufgrund ihres Hydrophobizitätsprofils recht leicht unterschieden werden. In der sinnvolleren Orientierung sollten die hydrophoben Seitenketten in die Membran zeigen. Für den jetzigen Fall, in dem die geladenen Seitenketten der amphiphilen Helix eher zur Seite als in Richtung der wässrigen Phase zeigen, müssen beide mathematisch möglichen Orientierungen betrachtet werden. Es besteht also die Möglichkeit, dass die transmembrane Helix $[\tau = 13^\circ; \rho_{\text{Val15}} = 235^\circ]$ entweder mit einer amphiphilen Helix der Orientierung $[\tau = 64^\circ; \rho_{\text{Ile29}} = 25^\circ]$ oder der Orientierung $[\tau = 116^\circ; \rho_{\text{Ile29}} = 205^\circ]$ verbunden ist.

Eine weitere Mehrdeutigkeit liegt in der Tatsache, dass die Orientierung der beiden Helices nur bezüglich der Membrannormalen bestimmt werden kann. Die Orientierung bezüglich einer Achse in der Membranebene ist jedoch nicht festgelegt. Anschaulich bedeutet dies, dass die transmembrane Helix auf einem Kegel liegen kann, wenn die Orientierung der amphiphilen Helix festgehalten wird. Somit ist der Winkel zwischen den beiden Helices (Δ_{TMS}) in beiden möglichen Kombinationsmöglichkeiten anhand der Festkörper-NMR Daten nicht festgelegt.

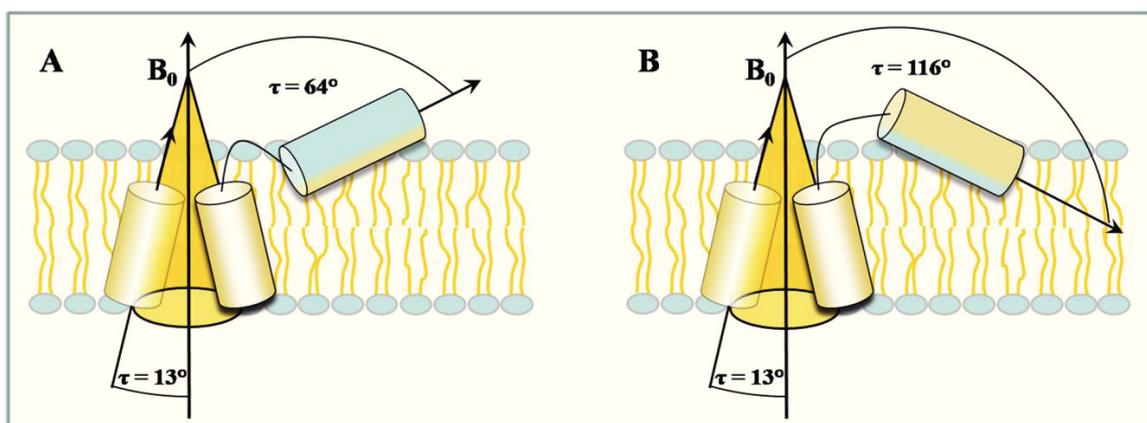


Abb. 88 Mögliche Orientierungen von TatA₂₋₄₅ aufgrund der Festkörper-NMR Daten

Aus den Ergebnissen der Festkörper-NMR alleine kann somit die Orientierung in der Membran nur soweit bestimmt werden wie in Abb. 88 gezeigt. Es existieren also zwei mögliche Strukturfamilien, welche sich grundlegend in der Lage der amphiphilen Helix unterscheiden.

Die Flüssigkeits-NMR liefert komplementäre Ergebnisse zur Festkörper-NMR, da mit ihr die lokale Struktur, aber nicht die Orientierung in der Membran bestimmt werden kann. Somit könnte die aus der Festkörper NMR gewonnenen Strukturfamilien weiter eingegrenzt werden, wenn der Winkel zwischen den beiden Helices Δ_{TMS} aus einer Flüssigkeits-NMR Strukturanalyse bekannt wäre. Weiterhin könnten auch eventuell beobachtete *long-range* NOEs die Orientierungsmöglichkeiten noch weiter einschränken. In unserer Flüssigkeits-NMR Analyse von TatA₂₋₄₅ in SDS-Mizellen konnten jedoch nur sehr wenige *long-range* NOEs beobachtet werden, weshalb die Struktur im Hinblick auf den Winkel zwischen den beiden Helices Δ_{TMS} deutlich unterbestimmt ist (vergleiche Abb. 87). Basierend auf diesen Ergebnissen ist somit eine weitere Einschränkung der aus der Festkörper-NMR erhaltenen Orientierungen leider nicht möglich.

Eine vor kurzem veröffentlichte Flüssigkeits-NMR Studie von Hu et al. an TatA_d in DPC-Mizellen konnte jedoch die lokale Struktur von TatA_d durch Messung von RDCs und weiterer NOEs aufklären [205]. Es konnte gezeigt werden, dass TatA_d eine L-förmige Struktur einnimmt mit einem Winkel zwischen den Helices von $\Delta_{\text{TMS}} \approx 90^\circ$. Betrachtet man nun wieder die bestimmten möglichen Orientierungen von TatA_d in der Membran, so kann der Winkel Δ_{TMS} für die Strukturfamilie mit in Richtung wässriger Phase zeigender APH ($\tau_{\text{APH}} = 64^\circ$) die Werte von $180^\circ - \tau_{\text{TMS}} - \tau_{\text{APH}}$ bis $180^\circ + \tau_{\text{TMS}} - \tau_{\text{APH}}$ und somit von $103^\circ - 129^\circ \pm 11^\circ$ annehmen. Die Strukturfamilie mit in die Membran zeigender APH ($\tau_{\text{APH}} = 116^\circ$) kann dementsprechend für Δ_{TMS} die Werte 51° bis $77^\circ \pm 11^\circ$ annehmen. Es zeigt sich also, dass für die Strukturfamilie mit $\tau_{\text{APH}} = 64^\circ$ nur der kleinstmögliche Winkel mit $\Delta_{\text{TMS}} \approx 103^\circ \pm 11^\circ$ und für die Strukturfamilie mit $\tau_{\text{APH}} = 116^\circ$ nur der größtmögliche Winkel mit $\Delta_{\text{TMS}} \approx 77^\circ \pm 11^\circ$ möglich ist. Um zwischen diesen beiden verbleibenden Möglichkeiten zu unterscheiden werden nun noch die von Hu et al. gemessenen *long-range* NOEs betrachtet [205].

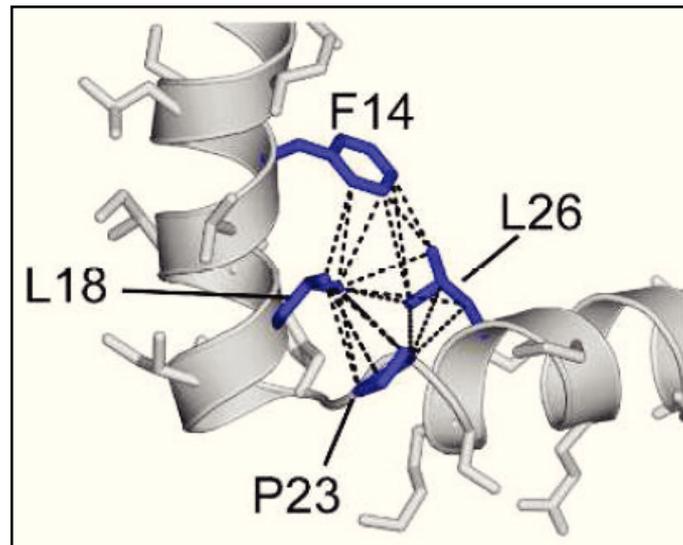


Abb. 89 *Long-range* NOEs der Loop-Region bei TatA_d nach Hu et al.
Abbildung übernommen aus [205].

Es wurde ebenfalls der *long-range* NOE zwischen Leu₁₈ und Pro₂₃ beobachtet, und außerdem konnten noch weitere *long-range* NOEs zwischen Phe₁₄, Leu₁₈ auf der transmembranen Helix, Pro₂₃ im Loop und Leu₂₆ auf der amphiphilen Helix gemessen werden (siehe Abb. 89). Mit diesen *long-range* NOEs lassen sich nun die beiden zuvor diskutierten möglichen Strukturen unterscheiden. Es zeigt sich, dass die Struktur mit $\Delta_{\text{TMS}} \approx 103^\circ \pm 11^\circ$ und den azimuthalen Rotationswinkeln $\rho_{\text{Val15}} = 235^\circ \pm 20^\circ$ und $\rho_{\text{Ile29}} = 25^\circ \pm 50^\circ$ zu der von Hu et al. bestimmten Flüssigkeits-NMR Struktur besser passt, da in dieser Orientierung die beobachteten Kontakte wahrscheinlicher sind.

Die Flüssigkeits-NMR Struktur von TatA_d nach Hu et al. [205] passt sehr gut zu der hier bestimmten Struktur von TatA₂₋₄₅ in der Membran. Nur der in der Flüssigkeits-NMR Struktur beobachtete Knick in der transmembranen Helix nach Ile₁₆ konnte aus den Festkörper-NMR Daten nicht bestätigt werden, da sich dieser im SAMMY-Spektrum am transmembranen PISA-*wheel* deutlich zeigen sollte. Der ebenfalls gezeigte Knick in der APH kann aus unseren Daten aufgrund des hohen Fehlers in dieser Region weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Diese beiden Strukturmerkmale könnten jedoch ein Artefakt aufgrund der stark gekrümmten Mizelle darstellen, in welcher die Flüssigkeits-NMR Struktur bestimmt wurde.

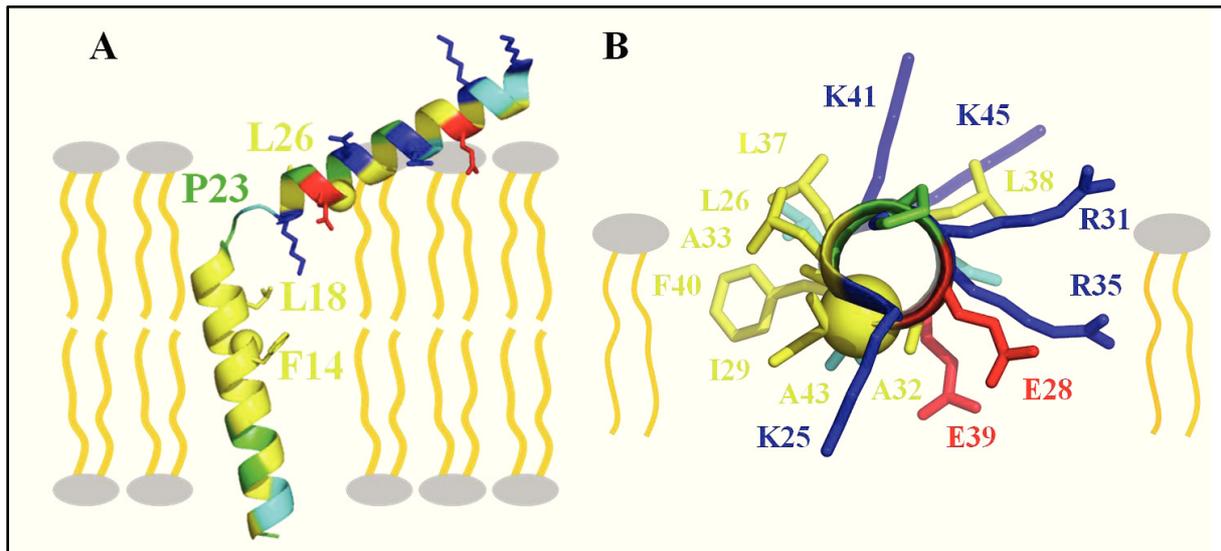


Abb. 90 **Dreidimensionales Strukturmodell von TatA₂₋₄₅ in der Membran [206]**

A: Darstellung der Orientierung von TatA₂₋₄₅ in der Membran.

Die N-terminale transmembrane Helix und die amphiphile Helix sind als ideale α -Helices dargestellt, wobei die Orientierung in der Membran durch Festkörper-NMR Spektroskopie bestimmt wurde und die lokale Struktur aus der Flüssigkeits-NMR Spektroskopie stammt. Die C α -Atome von Val₁₅ und Ile₂₉ sind mit einem Ball markiert, um die Rotationswinkel darzustellen. Die geladenen Seitenketten und die Seitenketten, für welche NOE's im Loop-Bereich beobachtet wurden, sind gezeigt.

B: Darstellung des azimuthalen Rotationswinkels der APH.

Durch Kombination der in dieser Arbeit bestimmten Orientierung von TatA₂₋₄₅ in der Membran mittels Festkörper-NMR und der Flüssigkeits-NMR Struktur von Hu et al. [205] konnte die dreidimensionale Struktur von TatA_d sowohl bezüglich ihrer Orientierung in der Membran als auch in ihrer lokalen Struktur vollständig aufgeklärt werden (siehe Abb. 90).

Wie bereits zuvor diskutiert, ist die ungewöhnliche Orientierung der geladenen Seitenketten der APH besonders auffallend (siehe Abb. 76). Aufgrund der vorliegenden Geometrie wurde daraufhin postuliert, dass die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Arg₃₅-Glu₃₉ und ebenso zwischen Lys₂₅-Glu₂₈ bzw. Glu₂₈-Arg₃₁ denkbar sei. Vielleicht spielt diese Fähigkeit zur Ausbildung von Salzbrücken im ungekürzten Protein TatA_d eine wichtige Rolle bei dessen Aufgabe im Tat-abhängigen Transport. Da TatA als die porenbildende Komponente angesehen wird [72, 74], könnte die ungewöhnliche Orientierung der APH eine wichtige Bedeutung bei der Assemblierung der Pore besitzen. So könnte die Oligomerisierung von TatA-Monomeren zu einer Pore durch die Ausbildung von intermolekularen Salzbrücken stattfinden. Um mögliche inter- oder intramolekulare Salzbrücken identifizieren zu können, wurde das Ladungsprofil von TatA_d aus *B. subtilis* betrachtet (siehe Abb. 91).

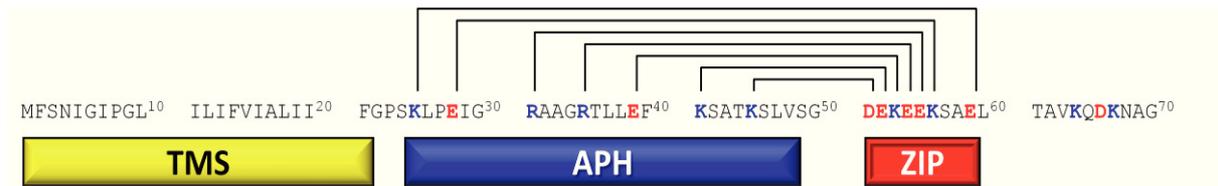


Abb. 91 **Der Charge-Zipper des TatA_d aus *B. subtilis***

Illustration der sieben möglichen Salzbrücken in TatA_d.

Die TMS ist aufgrund ihrer Hydrophobizität gelb, die APH aufgrund ihrer überwiegend positiven Ladung blau und eine weitere Region (ZIP) mit überwiegend negativer Ladung rot dargestellt.

Abbildung übernommen aus [207]

Es fällt auf, dass die Ladungen ein hochsymmetrisches Muster bilden, und es innerhalb der TatA_d-Sequenz zur Ausbildung von sieben möglichen Salzbrücken kommen kann. Dabei lässt sich das Ladungsmuster der APH, welche hauptsächlich positive Ladungen trägt, auf eine weitere hochgeladene Region spiegeln, welche hier als ZIP („Charge-Zipper“) bezeichnet wird und hauptsächlich negative Ladungen trägt. Damit die Salzbrücken ausgebildet werden können, muss die Länge der beiden Segmente möglichst identisch sein. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die APH eine α -helikale Struktur einnimmt, die mit einer Ganghöhe von 1,5 Å pro Aminosäure für die 21 beteiligten Aminosäuren (Lys₂₅-Lys₄₅) eine Gesamtlänge von 31,5 Å ergibt. Der ZIP hingegen besteht nur aus neun Aminosäuren (Asp₅₁-Glu₅₉), aber wenn man für diese Region ein β -Faltblatt postuliert, so ergibt sich aus dem Abstand zweier Aminosäuren von 3,5 Å im β -Faltblatt wieder eine Gesamtlänge von 31,5 Å. Der Charge-Zipper hätte somit eine genau passende Länge, um eine typische Membran mit 30 Å Dicke zu durchspannen.

Um zu überprüfen, ob dieses Ladungsmuster nur bei TatA_d aus *B. subtilis* auftritt oder eine generelle Eigenschaft von TatA ist, wurden die Ladungsmuster von TatA aus verschiedenen Organismen analysiert (siehe Abb. 92).

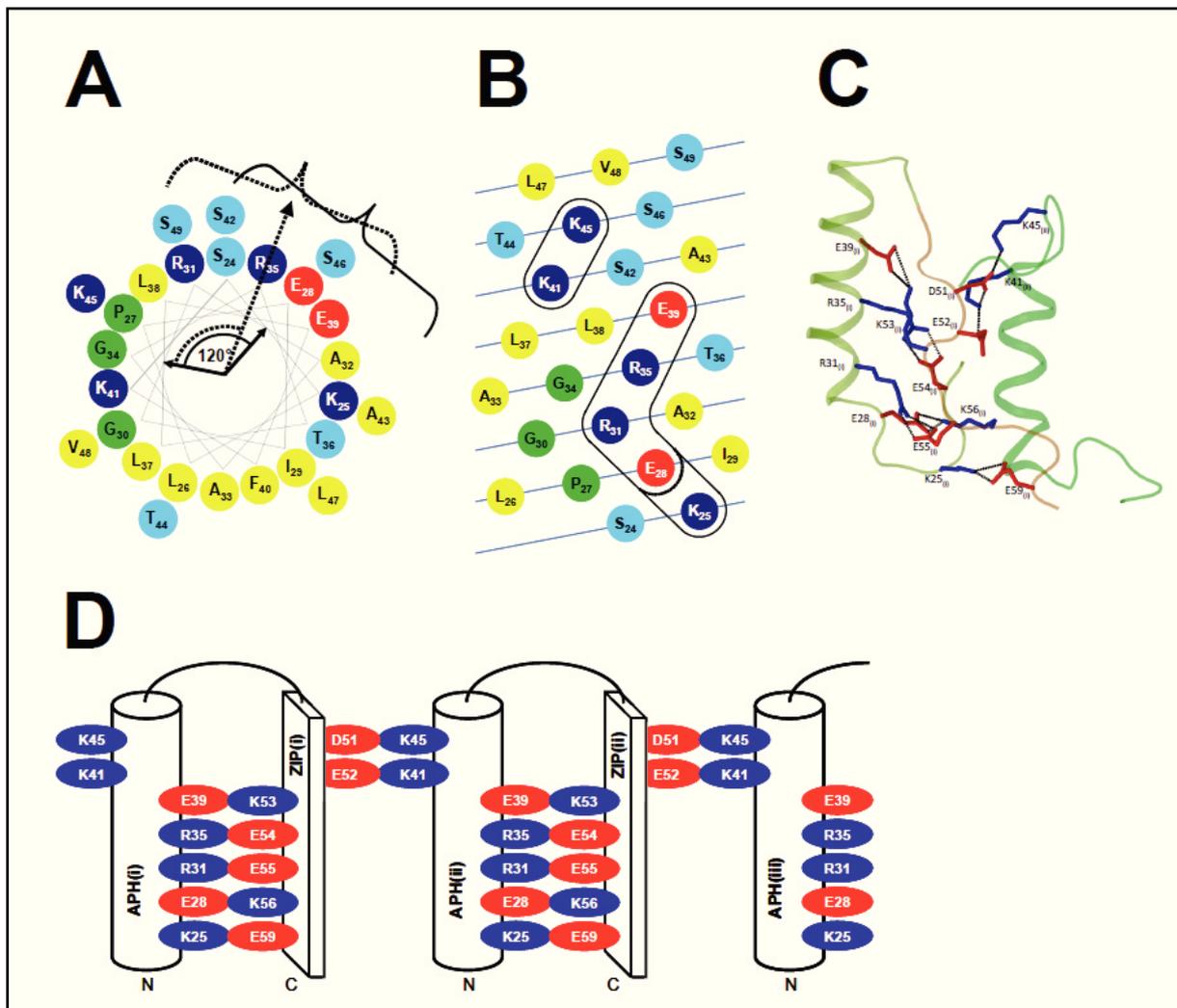


Abb. 93 Funktionsweise des Charge-Zippers

A: Helical wheel plot der APH von $TatA_d$ mit eingezeichneten Schwerpunktsvektoren der beiden Ladungspatches, wobei noch eine zweite Möglichkeit mit von der Helix aufgewickeltem Lys_{25} gezeigt ist.

B: Fläche Projektion der APH mit eingezeichneten Ladungspatches

C: Struktur des ZIP als β -Faltblatt zwischen zwei APH's, betrachtet von der hydrophilen Seite. Die Struktur wurde durch eine all-atom MD-Simulation bestimmt. Salzbrücken sind als schwarze Linien eingezeichnet.

D: Postulierte intra- und intermolekulare Salzbrücken zwischen $APH_{(i)}$ und $ZIP_{(i)}$ von $TatA_{(i)}$, $APH_{(ii)}$, $ZIP_{(ii)}$ von $TatA_{(ii)}$, usw.

Abbildung übernommen aus [207].

Mann kann sich nun vorstellen, wie mehrere $TatA$ -Monomere durch die beiden Ladungsgruppen auf ihren APHs verbunden werden. Die ZIP-Sequenz richtet sich dabei entlang der APH aus und bildet mit der einen Seite intramolekulare und mit der anderen Seite intermolekulare Salzbrücken zu der nächsten APH aus.

Generell gibt es zwei Möglichkeiten, wie sich die Salzbrücken ausbilden können. Entweder werden fünf intramolekulare Salzbrücken und zwei intermolekulare Salzbrücken gebildet, oder entsprechend umgekehrt. Betrachtet man den recht kurzen Loop (Ser₄₆-Gly₅₀) zwischen APH und ZIP, so ist es unwahrscheinlich, dass sich Asp_{51(i)} wieder auf die eigene APH_(i) zurückfalten kann, um mit Lys_{45(i)} eine Salzbrücke auszubilden. Somit bilden sich

wahrscheinlich die intramolekularen Salzbrücken Lys_{53(i)}-Glu_{39(i)}, Glu_{54(i)}-Arg_{35(i)}, Glu_{55(i)}-Arg_{31(i)}, Lys_{56(i)}-Glu_{28(i)}, and Glu_{59(i)}-Lys_{25(i)} und die intermolekularen Salzbrücken Asp_{51(i)}-Lys_{45(ii)}, Glu_{52(i)}-Lys_{41(ii)} aus (siehe Abb. 93D). Diese Anordnung konnte auch durch eine *all-atom* MD-Simulation in Zusammenarbeit mit Attilio Vargiu und Paolo Ruggerone (Universität Cagliari, Italien) bestätigt werden (siehe Abb. 93C).

Da die Seitenketten um die C_β-C_γ Bindung frei drehbar sind, können sie sich entweder auf die linke oder die rechte Seite des ZIP β-Faltblattes biegen und somit Salzbrücken ausbilden, ohne eine Torsion des ZIPs zu verursachen. Durch diese Flexibilität können die APHs entweder in einer fast geraden Reihe stehen, oder auch in einer leichten Biegung angeordnet sein, wodurch letztendlich die Porengröße festgelegt wird. Es konnte schon mehrmals gezeigt werden, dass TatA-Oligomere aus Tetramer-Einheiten aufgebaut sind [69-71]. Zur Ausbildung eines Tetramers würde demnach ein Winkel von 90° zwischen den APHs benötigt werden. Eine größere Pore mit beispielsweise 12 Monomeren würde hingegen einen Winkel von 150° zwischen den APHs benötigen. Der Winkel zwischen den beiden Ladungspatch-Schwerpunkten wurde auf etwa 120° geschätzt. Für den Fall, dass sich die APH am Beginn der Helix bei Lys₂₅ etwas aufwickelt, wäre der Winkel zwischen den Schwerpunkten etwas kleiner (siehe Abb. 93A). Man kann sich nun vorstellen, dass es mittels der flexiblen ZIPs in beiden Fällen noch möglich ist Salzbrücken auszubilden, um ein entsprechendes Oligomer zu assemblieren.

Eine solche Pore wäre im Inneren durch die Salzbrücken und einige Serine polar ausgekleidet und wäre somit gut geeignet um ein hydrophiles Substrat zu transportieren. Die Außenseite der Pore enthält viele hydrophobe Seitenketten, welche mit den umgebenden Lipiden und den transmembranen Helices wechselwirken können. Weiterhin besitzt die TMS ein GXXG-Motiv und die APH ein GXXXG-Motiv, welches häufig in dicht gepackten transmembranen Helices auftritt [208]. Deshalb kann spekuliert werden, dass sich die TMS und die APH über dieses Motiv dicht zusammenlagern können.

Im Folgenden soll ein möglicher Mechanismus der Oligomerisierung zur Pore dargestellt werden (siehe Abb. 94). Basierend auf der Tatsache, dass TatA in seiner inaktiven Form als Tetramer charakterisiert wurde [70] kann man sich vorstellen, dass vier TatA_d-Monomere einen ersten Kontakt über die intermolekularen Salzbrücken Asp_{51(i)}-Lys_{45(ii)} und Glu_{52(i)}-Lys_{41(ii)} herstellen können. Mit der darauffolgenden Ausbildung der intramolekularen Salzbrücken klappen die APHs in die Membran hinein und bilden das inaktive Tetramer. Dieses Tetramer stellt einen minimalen TatA-Komplex dar, aus welchem die höheren Oligomere aufgebaut werden können. Durch Bindung des Signalpeptids oder Anlagerung von

TatC über einen bisher noch nicht geklärten Mechanismus wird ein Transportsignal ausgelöst, woraufhin einige intermolekulare Salzbrücken gelöst werden und mehrere TatA-Tetramere seitlich miteinander verschmelzen. Hierbei kann man sich gut vorstellen, dass die Porengröße an das Substrat angepasst werden kann.

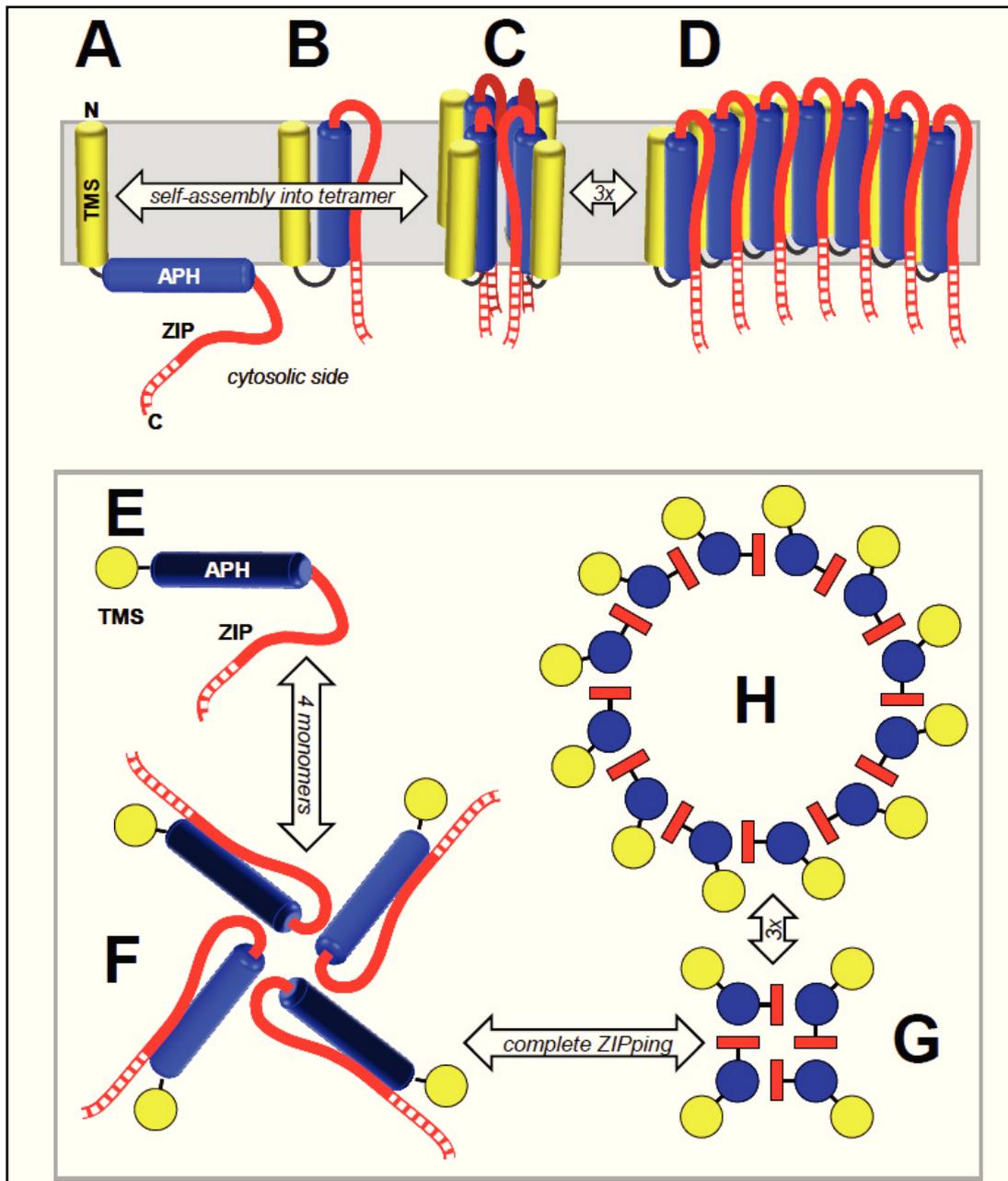


Abb. 94 **Mechanismus der Porenbildung mittels Charge-Zipper**

Postulierter Mechanismus der Porenbildung dargestellt im Membranquerschnitt (A, B, C, D) und als Draufsicht von der cytosolischen Seite (E, F, G, H). Als Monomer ist nur die L-förmige Orientierung stabil (A), die transmembrane Orientierung der APH ist als Monomer instabil (B).

Der Mechanismus der Oligomerisierung ist im Text beschrieben.

Abbildung übernommen aus [207].

MD-Simulationen mit einem Go-Model [209] in Kooperation mit Moritz Wolf und Wolfgang Wenzel (KIT Karlsruhe) konnten die Ausbildung des Tetramers und eines Dodecamers bestätigen. Als Randbedingungen wurden der helikale Charakter der TMS (Ile₅-Gly₂₂) und der APH (Leu₂₆-Val₄₈) ebenso wie die postulierten intra- und intermolekularen Salzbrücken verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass sich im Laufe der MD-Simulation aus zuvor isolierten TatA-Monomeren (verkürzt um die letzten 10 AS, welche nicht Teil des *Charge-Zippers* sind) in einer Membran-imitierenden Umgebung ein Tetramer, als auch ein Dodecamer ausbilden kann, welches bis zum Ende der Simulation stabil bleibt.

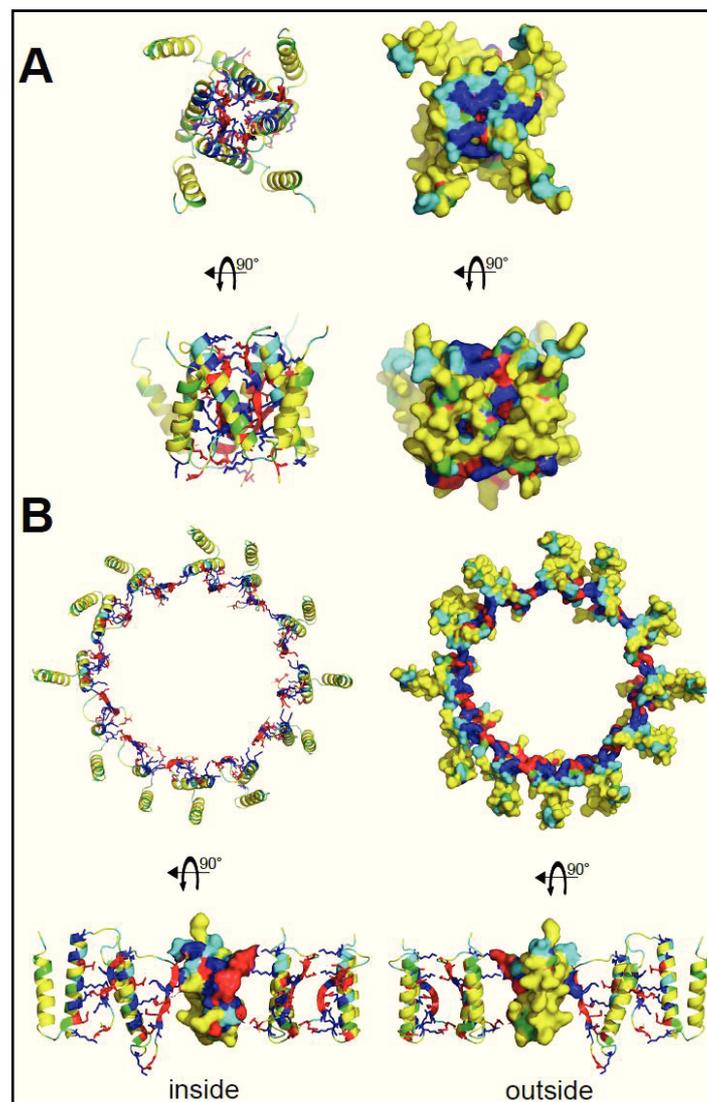


Abb. 95 **Strukturmodell der TatA-Pore basierend auf dem *Charge-Zipper* Mechanismus**

A: Strukturmodell eines Tetramers basierend auf dem *Charge-Zipper* Mechanismus. Erhalten aus einer MD-Simulation mit dem Go-Modell in einer Membran-imitierenden Umgebung. Es ist sowohl eine Draufsicht als auch eine Seitenansicht gezeigt.

B: Strukturmodell eines Dodecamers basierend auf dem *Charge-Zipper* Mechanismus. Erhalten aus einer MD-Simulation mit dem Go-Modell in einer Membran-imitierenden Umgebung. Es ist sowohl eine Draufsicht als auch eine Seitenansicht der hydrophilen Innenseite und hydrophoben Außenseite gezeigt.

Abbildung übernommen aus [207].

Das Tetramer ist durch die geladenen Seitenketten vollständig verschlossen was für eine inaktive Pore erwartet wird, da keine Protonen durch die Membran dringen dürfen (siehe Abb. 95A strukturfüllendes Modell). Die Außenseite ist hydrophob und die transmembranen Helices haben keinen direkten Kontakt, was in Übereinstimmung mit einer vorhergehenden Untersuchung mittels eines *TOXCAT-Essays* ist [210]. Diese Tetramer-Struktur stellt die inaktive Form dar, in welcher die Pore vollständig verschlossen ist. Ein höheres Oligomer wie beispielsweise das Dodecamer stellt hingegen eine geöffnete Pore dar, wobei die Öffnung mit vielen polaren und geladenen Gruppen ausgekleidet ist (siehe Abb. 95B unten links).

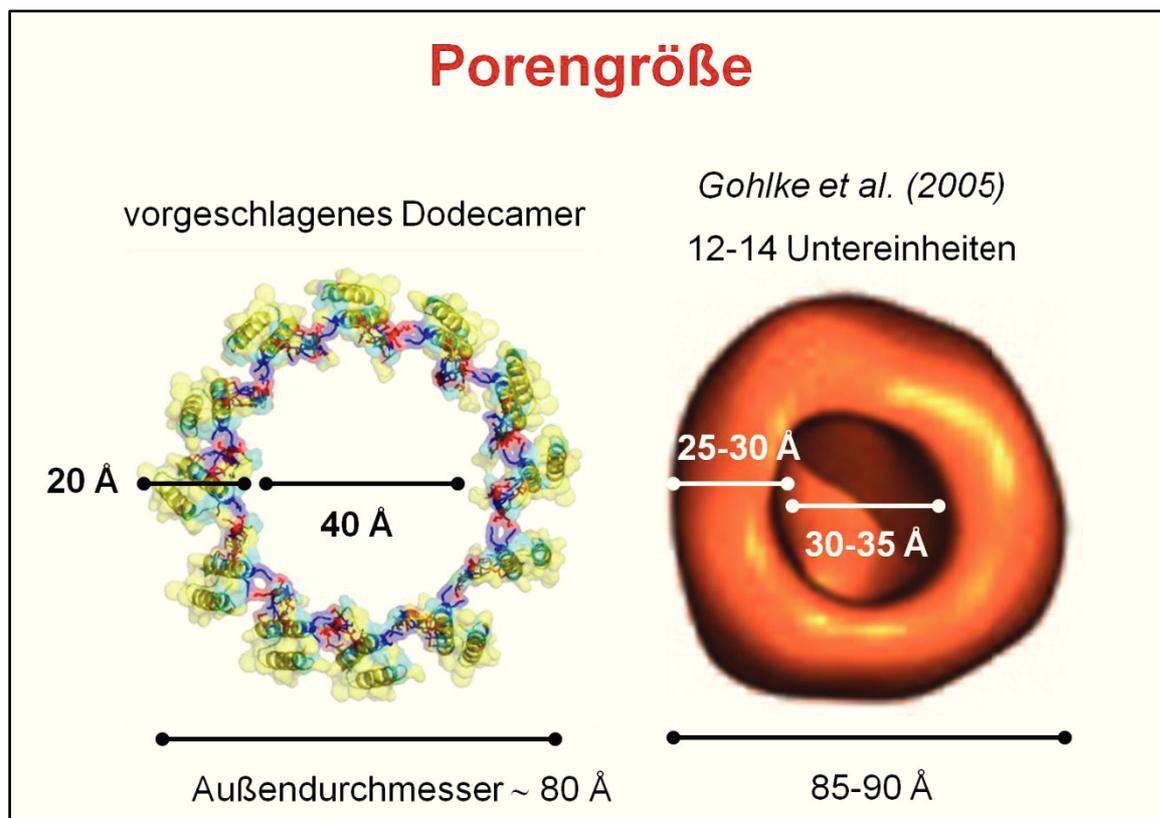


Abb. 96 **Größenvergleich des vorgeschlagenen TatA-Dodecamers mit einem von Gohlke et al. [74] charakterisierten TatA-Komplex (Klasse 1)**

Gohlke et al. [74] konnten mittels Elektronenmikroskopie verschiedene TatA-Komplexe mit unterschiedlicher Größe charakterisieren und teilten diese in Klassen ein. Der Klasse 1 Komplex besteht aus ca. 12-14 TatA-Monomeren und sollte demnach die Dimensionen des mittels *Charge-Zipping* gebildeten Dodecamers widerspiegeln. Ein Größenvergleich zeigt, dass die Dimensionen des *Charge-Zipping*-Modells sehr gut mit dem experimentell bestimmten Komplex übereinstimmen (siehe Abb. 96).

Es konnte also gezeigt werden, dass über den postulierten *Charge-Zipper* Mechanismus tatsächlich eine Oligomerisierung von TatA-Molekülen zu einer Pore möglich ist, und dass

das mittels MD-Simulation erhaltene Dodecamer sehr gut zu experimentellen Daten aus der Literatur passt. Dieses neuartige Strukturmotiv basierend auf einer elektrostatischen Wechselwirkung in einer hydrophoben Umgebung ermöglicht eine Verbindung von α -Helices über Salzbrücken.

Dieses neue *Charge-Zipper*-Motiv könnte auch in weiteren Proteinen auftreten und dort ein wichtiges, allgemeines Prinzip bei der Ausbildung der Quartärstruktur darstellen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Struktur des Proteins TatA_d aus *B. subtilis* untersucht werden, welches die porenbildende Komponente im Tat-abhängigen Transportkomplex darstellt.

Hierzu wurde das Protein zunächst in einer reduktionistischen Vorgehensweise in Fragmente unterteilt, welche den postulierten Sekundärstrukturelementen des Proteins entsprachen. Die TatA_d-Fragmente konnten biosynthetisch durch Überexpression in *E. coli* in hoher Ausbeute dargestellt und aufgereinigt werden. Mittels CD-Spektroskopie wurde ein hoher α -helikaler Anteil der jeweiligen Segmente nachgewiesen, und durch OCD-Spektroskopie konnte erstmals die postulierte Struktur im membrangebundenen Zustand experimentell bestätigt werden. TatA besteht somit aus einer N-terminalen transmembranen α -Helix, gefolgt von einer auf der Membran aufliegenden amphiphilen α -Helix und einem unstrukturierten C-Terminus.

Dieses qualitative Strukturmodell sollte anschließend mittels Festkörper-NMR weiter verfeinert werden. Hierzu wurde das Protein in orientierten Bizellen als Membran-imitierende Umgebung rekonstituiert. SAMMY-Spektren von uniform ¹⁵N- und selektiv ¹⁵N-markiertem TatA₂₋₄₅ in ungeflippten und geflippten Bizellen resultierten in hoch aufgelösten PISA-*wheels*, welche eine Bestimmung des Tiltwinkels τ und des azimuthalen Rotationswinkels ρ der beiden Helices erlaubte. Für die transmembrane Helix ergab sich eine Orientierung von $\tau = 13^\circ \pm 4^\circ$ mit einem Ordnungsparameter von $S = 0,8 \pm 0,03$ und einem Rotationswinkel von $\rho_{\text{Val15}} = 235^\circ \pm 20^\circ$. Für die Orientierung der amphiphilen Helix ergab sich entsprechend $\tau = 64^\circ \pm 10^\circ$, $S = 0,5 \pm 0,15$ und $\rho_{\text{Ile29}} = 25^\circ \pm 50^\circ$.

Aufgrund der Inversionssymmetrie der Tensoren führt die Kombination der beiden unabhängig voneinander bestimmten Orientierungen der APH und TMS zu einer Doppeldeutigkeit, wonach die Orientierung einer Helix mit dem Wertepaar $[\tau, \rho]$ nicht unterscheidbar ist von der Orientierung mit dem Wertepaar $[180 - \tau, 180 + \rho]$. Aus den Daten der Festkörper-NMR Spektroskopie alleine konnte somit keine eindeutige Orientierung insbesondere für die relative Orientierung der beiden Helices angegeben werden. Ein Vergleich mit einer kürzlich veröffentlichten Flüssigkeits-NMR Struktur von TatA_d in Mizellen [205] erlaubte jedoch eine weitere Einschränkung der möglichen Strukturmodelle. Somit konnte der Winkel zwischen den beiden Helices von TatA₂₋₄₅ letztendlich zu $\Delta_{\text{TMS}} = 103^\circ \pm 11^\circ$ bestimmt werden. Durch die Kombination der in dieser Arbeit erhaltenen Festkörper-NMR Ergebnisse und der Flüssigkeits-NMR Daten von Hu et al. [205] konnte die

dreidimensionale Struktur von TatA₂₋₄₅ sowohl bezüglich ihrer Orientierung in der Membran als auch in ihrer lokalen Struktur vollständig aufgeklärt werden.

Ein SAMMY-Spektrum des in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituierten Fragments TatA₂₂₋₄₅, welches nur aus der amphiphilen Helix besteht, ergab im Gegensatz zu TatA₂₋₄₅, eine fast flache Orientierung auf der Membran. Dies zeigte, dass die kurze transmembrane Helix in TatA₂₋₄₅ die Orientierung der APH stark beeinflusst. Die daraus resultierende steile Orientierung der APH, zusammen mit der Tatsache, dass die geladenen Seitenketten eher zur Seite als nach oben in Richtung wässriger Umgebung zeigen und somit nur durch die Ausbildung von intramolekularen Salzbrücken erklärt werden können, führten zu der Überlegung, dass diese ungewöhnliche Struktur mit der Funktion von TatA korreliert sein könnte.

Eine genauere Betrachtung der Sequenz von TatA_d offenbarte daraufhin ein hochsymmetrisches Ladungsmotiv, in welchem die überwiegend positiv geladenen Seitenketten der APH auf eine benachbarte, überwiegend negativ geladene Region gespiegelt werden. Diese negativ geladene Region wurde als neues Motiv der Proteinfaltung erkannt und als ZIP (von *Charge-Zipper*) bezeichnet, denn eine Sequenzanalyse von TatA ergab, dass dieses Strukturmotiv in allen untersuchten Organismen enthalten war. Es konnte daraufhin ein dreidimensionales Strukturmodell entwickelt werden, welches eine Poren-Bildung von TatA aufgrund von intra- und intermolekularen Salzbrücken des *Charge-Zippers* ermöglicht.

Dieses neuartige Strukturmotiv basiert auf einer elektrostatischen Wechselwirkung in einer hydrophoben Umgebung und ermöglicht eine Verbindung von α -Helices über Salzbrücken. Es könnte auch in anderen porenbildenden Proteinen, wie zum Beispiel Toxinen und apoptotischen Bcl-2 Analogen, eine weitreichende Bedeutung besitzen.

7 Material

Für die in dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten wurden die folgenden Geräte, Materialien und Chemikalien verwendet.

7.1 Geräte

| | |
|---------------------------------------|---|
| Autoklav | Varioklav, H + P Labortechnik Sanoclav S-ECZ, Wolf VX-95, Systec 2540 EL, Systec |
| Brutschrank | Incucell, MMM Medcenter Einrichtungen |
| CD Spektropolarimeter | J-810, JASCO J-815, JASCO |
| Elektroporationsgerät | MicroPulser, Bio-Rad |
| FPLC | ÄKTApurifier, GE Healthcare GradiFrac, Pharmacia Biotech |
| French-Press | SLM-Aminco, Spectronic Instruments |
| Gasbrenner | Schütt flammy S, Schütt Labortechnik |
| Geldokumentationssystem | Vilber Lourmat |
| Geldokumentationssystem (Photo-Print) | P91, Mitsubishi |
| Gelelektrophorese (Agarose) | PerfectBlue, PEQLAB Biotechnologie |
| Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad |
| Heizblock | HB-2, Wealtec Corp. |

| | |
|---|--|
| Inkubationsschüttler | G25, New Brunswick Scientific Innova 44, New Brunswick Scientific Minitron AI 72, HT Infors AG |
| Kühlschränke 4°C bzw. - 20°C - 80°C | Siemens Herafreeze, Heraeus Instruments |
| Lyophilisator | Alpha 2-4, Christ Alpha 2-4 LD, Christ |
| Magnetrührer | MR 80, Heidolph RCT, IKA Labortechnik |
| Massenspektrometer (MALDI-TOF) | Autoflex III, Bruker Daltonics |
| Membranpumpe | MZ 2C, Vacuubrand |
| Mikrowelle | M1712 N, Samsung |
| NMR-Spektrometer | Avance III, 500 MHz (Ultrashield) <i>Wide Bore</i> , Bruker Biospin Avance, 500 MHz (Ultrashield) <i>Wide Bore</i> , Bruker Biospin Avance, Bruker Biospin, 500 MHz (AS) WB, Magnex Scientific Avance, 600 MHz (Ultrashield) <i>Standard Bore</i> , Bruker Biospin |
| NMR-Probenkopf | HXY Triple Resonance, statisch, austauschbare Spule, Bruker Biospin |
| pH-Messgerät | QpH 70, VWR International pH 315i, WTW |

| | |
|---|---|
| Pipetten | |
| 0,5 - 10 μ l, 2 - 20 μ l, 10 - 100 μ l, | Reference, Eppendorf |
| 50 - 200 μ l, 100 - 1000 μ l | |
| 1 - 5 ml, 2 - 10 ml | Finnpipette, Thermo Scientific |
| Reinraumbank | Herasafe, Heraeus Instruments |
| Reinstwasseranlage | Milli-Q, Millipore |
| Stromversorger | E455, Consort Power Pac 300, Bio-Rad Power Pac Basic, Bio-Rad |
| Thermocycler | PCR Express, Hybaid Progene, Techne |
| Trockenschrank | 600, Memmert |
| Ultraschallgeräte | Branson Sonifier 250, G. Heinemann Ultraschall und Labortechnik Sonorex super RK510, Bandelin electronic |
| UV/VIS-Spektrophotometer | SmartSpec Plus, BioRad |
| Vortexer | Genie K-550-GE, Bender und Hobein |
| Waagen | |
| Ablesbarkeit 0,1 g | PB 3001, Mettler Toledo |
| Ablesbarkeit 0,1 mg | A 200 S, Sartorius CP 64, Sartorius |
| Ablesbarkeit 0,001 mg | M2P, Sartorius |
| Wasserbad | 1008, Gesellschaft für Labortechnik B-480, Büchi Waterbath |

| | |
|-------------------------|---|
| Wasserbad Thermostat | U3 - 7A, Julabo A100, LAUDA |
| Western –Blot Apparatur | PerfectBlue Semi-Dry Elektroploetter, PEQLAB Biotechnologie |
| Zentrifugen | 3-18 K, Sigma Avanti Centrifuge J-25, Beckman Biofuge fresco, Heraeus Instruments Centrifuge 5415 C, Eppendorf Centrifuge 5417 R, Eppendorf RC 2-B, Sorvall RC 5-B Plus, Sorvall L8-M, Beckman |
| Zentrifugenrotoren | 19776-H, Sigma 50Ti, Beckman J-Lite JLA-9.1000, Beckman JA-14, Beckman SLA-3000 Super-Lite GS-3, Sorvall |

7.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| Aluminiumfolie | Rotilabo-Aluminiumfolie, Roth |
| Autoklavierband | Comply Indicator Tape, 3M |
| Blotting Papier | Gel-Blotting-Papiere, Schleicher & Schuell |
| Deckgläser (7,5 x 12 mm) | Marienfeld |
| Dialysierschlauch (3,5 kDa MWCO), 10ml | Float-A-Lyzer, Spectrum Laboratories |
| Dialysierschlauch (1 kDa MWCO), 10ml | Float-A-Lyzer, Spectrum Laboratories |
| Dialysemembran (3,5 kDa MWCO) | Spectra/Por 6, Spectrum Laboratories |
| Einmalspritzen (20 ml, 10ml, 1 ml) | Injekt, B. Braun |
| Einmalspritze für Gummistopfen NMR-Gefäß | BD Micro U40, Becton Dickinson |
| Einmalsterilfilter (0,22 µm) | Rotilabo-Spritzenfilter steril, Roth |
| Einmalsterilfilter (0,45 µm) | Rotilabo-Spritzenfilter unsteril, Roth |

| | |
|--|--|
| Elektroporationsküvette | Eppendorf |
| Halbmikroküvetten (1 ml) | Sarstedt |
| Nitrozellulosemembran | PEQLAB |
| NMR-Gefäß (5 mm) | New Era Enterprises |
| NMR-Glascontainer (7,7 x 2,2 x 30 mm) | New Era Enterprises |
| NMR-Probenröhrchen mit Kappe (5 mm) | Wilmad LabGlass |
| Parafilm | Laboratory film, American National Can |
| Petrischalen | Sarstedt |
| Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 10 µl) | Sarstedt |
| Pipettenspitzen (5 ml) | Finnpipette, Thermo Scientific |
| Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml) | Sarstedt |
| Rührzelle (3 kDa MWCO) | Omega Cell, Pall |
| Rührzelle (1 kDa MWCO) | Omega Cell, Pall |
| Ultrazentrifugenröhrchen | Beckman |
| UV-Küvetten mikro (70µl) | PLASTIBRAND, Brand |
| Wägepapier | MN 226, Macherey-Nagel |
| Wägeschälchen | Rotilabo-Einmal-Wägeschälchen, Roth |
| Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) | Falcon-Tubes, Sarstedt |

7.3 Chemikalien

| | |
|--|-------------------------|
| 6-O-PC | Avanti Polar Lipids |
| Acetonitril | Fisher Scientific |
| Acrylamid | Applichem |
| Agar | Roth |
| Agarose | PEQLAB |
| Agarose | Sigma |
| Albumin Fraktion V | Roth |
| Ameisensäure | Roth |
| Aminocaproat | Fluka |
| Aminosäuren | Sigma-Aldrich |
| Aminosäuren (¹⁵ N-markiert) | Specta Stable Isotopes |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Roth |
| Ammoniumsulfat | Acros Organic |
| Ammoniumsulfat (¹⁵ N-markiert) | Spectra Stable Isotopes |

| | |
|---|-------------------------|
| Ammoniumchlorid | Fluka |
| Ammoniumchlorid (¹⁵ N-markiert) | Spectra Stable Isotopes |
| Bactotrypton | AppliChem |
| Benzamidin-Hydrochlorid | Merck |
| Borsäure | Roth |
| Bromcyan | Fluka |
| Bromphenolblau | Merck |
| Calciumchlorid | Roth |
| 4-Chlor-1-naphtol | AppliChem |
| Chloroform | Roth |
| Cholinchlorid | AppliChem |
| Cobaltchlorid | AppliChem |
| Coomassie Brilliant Blue R250 | Serva |
| D(+)-Biotin | AppliChem |
| DHPC | Avanti Polar Lipids |
| Dikaliumhydrogenphosphat | AppliChem |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Aldrich |
| Dinatriumhydrogenphosphat | AppliChem |
| 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT) | Fluka |
| DMPG | Avanti Polar Lipids |
| DMPC | Avanti Polar Lipids |
| D ₂ O | Sigma-Aldrich |
| D-Pantothenat | AppliChem |
| DPC | Avanti Polar Lipids |
| Essigsäure | Roth |
| Eisen(II)-Sulfat | Fluka |
| Ethanol | Merck |
| Ethidiumbromid | Sigma |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Fluka |
| Glucose | Fluka |
| Glucose (¹³ C-markiert) | Spectra Stable Isotopes |
| Glycerin | Roth |
| Folsäure | AppliChem |
| Hefeextrakt | AppliChem |

| | |
|---|---------------------|
| Imidazol | Roth |
| IPTG | Roth |
| Isopropanol | Merck |
| Kaliumdihydrogenphosphat | AppliChem |
| Kanamycin | AppliChem |
| Kupfer(II)-Chlorid | Laborbedarf A. Ebel |
| Mangan(II)-Chlorid | Fluka |
| Magnesiumchlorid | Fluka |
| Methanol | Fisher Scientific |
| Natriumazid | Roth |
| Natriumchlorid | Fisher Scientific |
| Natriumdihydrogenphosphat | AppliChem |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | AppliChem |
| Natriumdodecylsulfat deuteriert (SDS-d25) | Euriso-top |
| Natriumhydroxid | Riedel-de Haën |
| Natriumlauroylsarcosin (NLS) | Fluka |
| Natriumphosphat | Fluka |
| Niacinamid | AppliChem |
| Nickelsulfat | Fluka |
| Pefabloc | Roth |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | AppliChem |
| Polyethylenglycol (PEG) | Fluka |
| Pyridoxal | AppliChem |
| Salzsäure | Roth |
| Stickstoff | Messer Griesheim |
| Tetramethyldiamin (TEMED) | Roth |
| Thiamin-Hydrochlorid | AppliChem |
| Trifluoressigsäure | Roth |
| Tris | AppliChem |
| Tris-Hydrochlorid | Roth |
| Triton X-100 | Sigma |
| Trypton | Roth |
| Tween 20 | Roth |
| Wasserstoffperoxid | Roth |

YbCl₃

Sigma-Aldrich

Zinksulfat

AppliChem

7.4 Marker

7.4.1 DNA Marker

peqGOLD DNA-Sizer III

PEQLAB

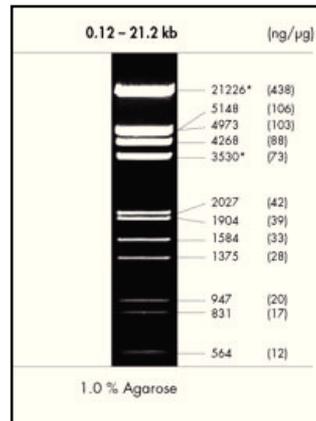


Abb. 97 **peqGOLD DNA-Sizer III**
Abbildung der Produktbeschreibung des Herstellers entnommen.

7.4.2 Protein Marker

PageRuler Protein Ladder

Fermentas

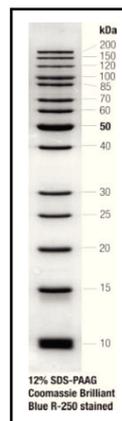


Abb. 98 **PageRuler Protein Ladder**
Abbildung der Produktbeschreibung des Herstellers entnommen.

7.4.3 Western-Blot Marker

PageRuler Prestained Protein Ladder Plus

Fermentas

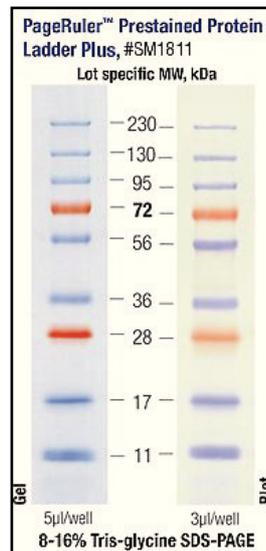


Abb. 99 **PageRuler Prestained Protein Ladder Plus**
Abbildung der Produktbeschreibung des Herstellers entnommen.

7.5 Kits für die Molekularbiologie

E.Z.N.A Plasmid Minprep I

PEQLAB

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit

Stratagene

7.6 Chromatographiesäulen

Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

HisTrap FF 5ml, Amersham Biosciences

Gelfiltrationschromatographie

HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade,
Amersham Bioscience

7.7 Enzyme

Benzonase

Merk

DpnI

Fermentas

Lysozym

Applichem

Pfu DNA-Polymerase

Fermentas

7.8 Vektoren

| Name | Induktion | Promotor | Resistenz | Tag | Hersteller |
|------------|-----------|----------|-----------|-----|------------|
| pET-28a(+) | IPTG | T7 | KAN | His | Novagen |

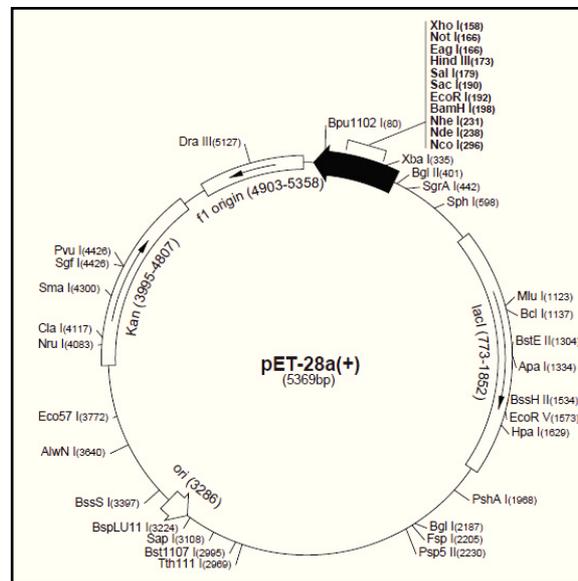


Abb. 100 **Expressionsvektor pET-28a(+)**
Abbildung der Produktbeschreibung des Herstellers entnommen.

7.9 Bakterienstämme

| | |
|--------------------------|----------------------------|
| <i>E. coli</i> JM109 | Promega |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | Novagen |
| <i>E. coli</i> C41(DE3) | J.E. Walker, Cambridge, UK |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | Stratagene |

7.10 Expressionsstämme

| | |
|--|--|
| <i>E. coli</i> TG1 pREP4/pQE9-TatA _d | Dr. Jörg Müller, Universität Jena |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28-TatA ₁₋₇₀ | Dr. Christian Lange, Universität Karlsruhe |
| <i>E. coli</i> C41(DE3) pET-28-TatA ₁₋₂₇ | Dr. Christian Lange, Universität Karlsruhe |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28-TatA ₂₂₋₇₀ | Dr. Sonja Müller, Universität Karlsruhe |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28-TatA ₁₋₄₅ | Torsten Walther, Universität Karlsruhe |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28-TatA _{1-45F21M} | Torsten Walther, Universität Karlsruhe |

7.11 Antikörper

| | |
|------------------------------|---------|
| Anti-mouse HRP conjugate | Novagen |
| Mouse anti-HisTag monoclonal | Novagen |

7.12 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

7.12.1 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

| | |
|--|--|
| LB-Medium: | 10 g Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen, pH = 7,5 einstellen, autoklavieren |
| M9-Salz-Lösung (ohne ¹⁴ NH ₄ Cl) | 13 g KH ₂ PO ₄ 10 g K ₂ HPO ₄ 9 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g Na ₂ SO ₄ mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren |
| Spurenelement-Lösung | 0,6 g FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,6 g CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,12 g MnCl ₂ ·4H ₂ O 80 mg CoCl ₂ ·6H ₂ O 70 mg ZnSO ₄ ·7H ₂ O 30 mg CuCl ₂ ·2H ₂ O 2 mg H ₃ BO ₃ 0,5 g EDTA mit bidest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen, steril filtrieren, bei 4 °C lagern |
| Vitaminmix | 10 mg Biotin 10 mg Cholinchlorid 10 mg Folsäure 10 mg Niacinamid 10 mg D-Pantothentat 10 mg Pyridoxal |

| | |
|------------------------------------|---|
| | 1 mg Riboflavin mit bidest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen, steril filtrieren, bei 4 °C lagern |
| MgCl ₂ (1M) | 20,33 g MgCl ₂ ·6H ₂ O mit bidest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen, steril filtrieren, bei 4 °C lagern |
| Thiamin (5 mg/ml) | 0,5 g Thiamin mit bidest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen, steril filtrieren, bei -20 °C lagern |
| LB-Kan-Platten | 500 ml LB-Medium 8 g Agar pH = 7,5 einstellen, autoklavieren nach Abkühlung 500 µl Kan50 zugeben und in Petrischalen gießen (ca.25 ml) |
| Kanamycin-Lösung (50 mg/ml; Kan50) | 0,5 g Kanamycin mit bidest. H ₂ O auf 10 ml auffüllen steril filtrieren, bei -20 °C lagern |
| SOC-Medium | 20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,6 g NaCl 0,2 g KCl mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen, pH = 7,0 einstellen, autoklavieren nach Abkühlen zugeben: 10 ml MgCl ₂ (1 M), steril filtriert 10 ml MgSO ₄ (1 M), steril filtriert 10 ml Glucose (2 M), steril filtriert bei -20 °C lagern |

| | |
|------------------------------|--|
| IPTG-Lösung (200 mM) | 0,48 g IPTG mit bidest. H ₂ O auf 10 ml auffüllen steril filtrieren, bei -20 °C lagern |
| Glucose (20%) | 20 g Glucose mit bidest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen, sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern |
| PMSF-Lösung (100 mM) | 0,17 g PMSF mit DMSO auf 10 ml auffüllen bei -20 °C lagern |
| Pefabloc-Lösung (20 mM) | 48 mg Pefabloc mit bidest. H ₂ O auf 10 ml auffüllen bei -20 °C lagern |
| Benzamidin-Lösung (478,8 mM) | 0,75 g Benzamidin-Hydrochlorid mit bidest. H ₂ O auf 10 ml auffüllen bei -20 °C lagern |
| Glycerinlösung (10%) | 100 ml Glycerin auf 900 ml bidest. H ₂ O |
| TSS-Lösung | 1,23 g MgSO ₄ ·7H ₂ O 10 g PEG 5 ml DMSO mit LB-Medium (pH = 6,5) auf 100 ml auffüllen, bei -20 °C lagern |

7.12.2 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

| | |
|-----------------------|--|
| TAE-Puffer, 50x | 242 g Tris-HCl 57,1 ml Essigsäure 100 ml EDTA-Lösung (0,5 M) mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen, pH = 7,0 einstellen |
| Ethidiumbromid Lösung | 10 mg Ethidiumbromid mit bidest. H ₂ O auf 10 ml auffüllen |

7.12.3 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

| | |
|--------------------|--|
| Anodenpuffer | 24,22 g Tris mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen pH = 8,9 einstellen |
| Kathodenpuffer | 12,11 g Tris 17,92 g Tricin 1 g SDS mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen |
| 4x Tris-HCl-Lösung | 6,05 g Tris mit bidest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen pH = 6,8 einstellen (mit HCl), filtrieren (0,45 µm Membran) 0,4 g SDS zugeben |
| Tris-Cl-Lösung | 36,4 g Tris mit bidest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen pH = 8,45 einstellen (mit HCl), filtrieren (0,45 µm Membran) 0,3 g SDS zugeben |

| | |
|--------------------------|---|
| 2x SDS-PAGE Probenpuffer | 1,75 ml 1 M Tris (pH = 6,8) 1,5 ml Glycerin 0,5 g SDS 0,24 g DTT 1 Spatelspitze Bromphenolblau mit bidest. H ₂ O auf 10 ml auffüllen bei 4 °C lagern |
| Färbe-Lösung | 1 g Coomassie G-250 50 ml Essigsäure 450 ml Ethanol mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen |
| Fixier-Lösung | 500 ml Ethanol 100 ml Essigsäure mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen |
| Entfärber-Lösung | 250 ml Ethanol 50 ml Essigsäure mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen |
| APS-Lösung (100 mg/ml) | 1 g Ammoniumpersulfat mit bidest. H ₂ O auf 10 ml auffüllen bei -20 °C lagern |
| 5% Glutaraldehyd | 10 ml Glutaraldehyd (ca. 50%) mit bidest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen |

7.12.4 Puffer und Lösungen für den Western-Blot

| | |
|----------------|---|
| Anodenpuffer I | 36,34 g Tris 200 ml Methanol mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen pH = 10,4 einstellen |
|----------------|---|

| | |
|-----------------------------|--|
| Anodenpuffer II | 3,03 g Tris 200 ml Methanol mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen pH = 10,4 einstellen |
| Kathodenpuffer | 5,24 g Aminocaproat 0,1 g SDS mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen pH = 7,6 einstellen |
| PBS-Puffer | 0,54 g KH ₂ PO ₄ 2,85 g Na ₂ HPO ₄ 6,72 g NaCl mit dest. H ₂ O auf 1 l auffüllen |
| PBS- <i>blocking</i> Puffer | 3 g BSA 500 µl Tween 20 mit PBS-Puffer auf 100 ml auffüllen bei 4 °C lagern |
| PBS-Tween-Puffer | 100 µl Tween 20 mit PBS-Puffer auf 100 ml auffüllen |
| Chlornaphtol-Lösung | 0,3 g 4-Chlor-1-Naphtol mit Methanol auf 10 ml auffüllen bei -20 °C lagern |

7.12.5 Puffer und Lösungen für die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

| | |
|------------------------------|--|
| Nickelsulfat-Lösung (100 mM) | 15,5 g NiSO ₄ mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen |
|------------------------------|--|

Stripping-Puffer
2,84 g Na₂HPO₄
29,22 g NaCl
14,61 g EDTA
mit bidest. H₂O auf 1 l auffüllen,
pH = 7,4 einstellen,
filtrieren und entgasen

Binding-Puffer
2,84 g Na₂HPO₄
29,22 g NaCl
1,36 g Imidazol
mit bidest. H₂O auf 1 l auffüllen,
pH = 7,4 einstellen,
filtrieren und entgasen

Elution-Puffer
2,84 g Na₂HPO₄
29,22 g NaCl
34,04 g Imidazol
mit bidest. H₂O auf 1 l auffüllen,
pH = 7,4 einstellen,
filtrieren und entgasen

7.12.6 Puffer für Gelfiltration

Laufpuffer
1,42 g Na₂HPO₄
8,77 g NaCl
mit bidest. H₂O auf 1 l auffüllen,
pH = 7,0 einstellen,
filtrieren und entgasen

7.13 Software

Topspin Bruker Biospin
XWINNMR Bruker Biospin
Sparky www.cgl.ucsf.edu/home/sparky [211]
NMRpipe www.nmrscience.com/nmrpipe.html [212]
PyMOL www.pymol.org [200]

UNICORN

GE Life Sciences

Spectra Manager

Jasco

PeptideMass

<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>

ProtParam

www.expasy.org/tools/protparam.html

ClustalW

www.ebi.ac.uk/clustalw [40]

Jalview

www.jalview.org [41]

8 Methoden

8.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

8.1.1 Steriltechnik

Alle Arbeiten, die sterile Bedingungen erfordern, werden unter der Reinraumbank durchgeführt. Die verwendeten Glasgeräte werden zuvor mit einer Alufolie abgedeckt und im Trockenschrank bei 200 °C für 3 Stunden sterilisiert. Die übrigen Verbrauchsmaterialien wie z. B. Pipettenspitzen, aber auch Lösungen werden im Autoklaven bei einer Temperatur von 121 °C und einem Wasserdampfüberdruck von 1 bar für 20 min sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen werden mit einem Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert. Vor der Entnahme von Lösungen werden die Öffnungen der Behältnisse abgeflammt.

8.1.2 Ansetzen einer Übernachtskultur

In einen 100 ml Erlenmeyerkolben werden 20 ml LB-Medium, 200µl Glucose-Lösung (20%) und das entsprechende Antibiotikum in der jeweiligen Konzentration gegeben. Zum Animpfen wird mit einer ausgeglühten Drahtöse von einer Agarplatte eine Bakterienkolonie entnommen und in den Erlenmeyerkolben überführt. Die Übernachtskultur wird im Schüttler bei 37 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 rpm über Nacht inkubiert.

8.1.3 Ansetzen einer Glycerinkultur

Aus einer Übernachtskultur werden 500 µl Zellkultur in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und mit 500 µl 50%iger Glycerinlösung vermischt. Die Glycerinkultur wird bei -80 °C gelagert.

8.1.4 Herstellung von Agar-Platten

Es werden 500 ml LB-Medium mit 8 g Agar versetzt und ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Nun wird die Lösung autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 40 °C bis 50 °C wird das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Anschließend wird die Lösung gleichmäßig unter der Reinraumbank in Petrischalen ausgegossen.

8.1.5 Ausstrich aus einer Glycerinkultur

Mit einer ausgeglühten Drahtöse wird etwas Zellkultur aus dem Glycerinstock entnommen und auf einer Agar-Platte ausgestrichen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Bakterienmenge

beim Ausstrich verdünnt wird. Die Agar-Platten werden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

8.2 Genetische Arbeitsmethoden

8.2.1 Plasmid-DNA Isolierung

Die Plasmidisolierung wird mit dem E.Z.N.A Plasmid Miniprep I Kit der Firma PEQLAB durchgeführt. Zu Beginn werden 4 ml der Übernachtskultur entnommen und in zwei Eppendorfgläser aufgeteilt. Die Zellen werden bei 5000 x g für eine Minute abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Die Bakterienpellets werden in 250 µl RNase-haltiger Lösung I resuspendiert und vereinigt. Nun werden 250 µl Lösung II zugegeben und durch sechsmaliges Invertieren des Gefäßes vermischt, wodurch die Zellen aufgeschlossen werden. Nach einer zweiminütigen Inkubationszeit sollte sich ein klares Lysat gebildet haben. Dieses Lysat wird durch Zugabe von 350 µl Lösung III neutralisiert. Nach mehrmaligem Invertieren bildet sich ein weißes, flockiges Präzipitat, welches bei 10.000 x g für 10 Minuten abzentrifugiert wird. Es wird eine HiBind-Miniprep-Zentrifugensäule in ein 2 ml Sammel-Gefäß gestellt. Der klare Überstand wird auf die Säule aufgetragen und für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Hierbei bindet die Plasmid-DNA auf der Säule und der Säulendurchfluss wird verworfen. Nun wird mit 500 µl HB-Puffer gewaschen um Proteinkontaminationen zu entfernen. Dieser Waschpuffer wird ebenfalls durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 x g entfernt. Jetzt wird noch zweimal mit jeweils 750 µl DNA-Waschpuffer gewaschen und anschließend wird die Säule durch nochmaliges Zentrifugieren getrocknet. Zur Elution wird die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfglas gestellt und mit 100 µl bidest. H₂O überschichtet. Es wird nochmals für eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA von der Säule gewaschen wird.

8.2.2 Ethanolfällung der Plasmid-DNA

50 µl der isolierten Plasmid-DNA werden in ein 1,5 ml Eppendorfglas überführt. Nun werden 125 µl 100%iges, eiskaltes Ethanol und 5 µl Natriumacetat (3 M, pH = 4,8) hinzugefügt. Das Gemisch wird für mindestens 30 min bei -80 °C inkubiert. Nun wird die ausgefallene Plasmid-DNA für 20 min bei 18.000 x g in einer vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 125 µl eiskaltem, 70%igem Ethanol gewaschen. Jetzt wird nochmals für 5 Minuten bei 18.000 x g zentrifugiert und der

Überstand verworfen. Abschließend wird das Pellet unter der Reinraumbank an der Luft getrocknet.

8.2.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wird von der Firma MWG-Biotech durchgeführt. Hierzu wird die aus der Ethanolfällung erhaltene Plasmid-DNA an die Firma MWG-Biotech geschickt.

8.2.4 Primer Design

Nach dem Protokoll des Stratagene *Quick Change Site-Directed Mutagenesis* Kits sollen die Primer eine Länge zwischen 25 und 45 Nukleotide haben und die Schmelztemperatur T_m sollte ≥ 78 °C sein. Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte der Sequenz liegen. Außerdem wird ein Guanin/Cytosin-Gehalt von mindestens 40% empfohlen und die Sequenz sollte mit einem oder mehreren Guaninen bzw. Cytosinen enden, damit es bedingt durch die stärkere Guanin-Cytosin Bindung (3 Wasserstoffbrücken im Vergleich zu 2 Wasserstoffbrücken bei Adenin-Thymin) zu einer besseren Anhaftung des Primers an den DNA-Strang kommt.

Die Schmelztemperatur T_m der Primer kann laut dem Protokoll des Mutagenese-Kits nach folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \cdot (\%GC) - \frac{675}{\sum N} - \% mismatch$$

N = Anzahl der Nukleotide; %GC = GC-Gehalt in Prozent; % mismatch = ausgetauschte AS in Prozent

Die Primer wurden anschließend von der Firma MWG-Biotech synthetisiert.

8.2.5 Mutagenese

Die Mutagenese wird nach der Vorschrift des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* Kits der Firma Stratagene durchgeführt. Zu Beginn werden geeignete Primer mit der gewünschten Mutation bei der Firma MWG Biotech bestellt. Anschließend wird mit den Primern eine PCR durchgeführt, wobei die gewünschte Mutation in das Plasmid eingebaut wird. Das Endvolumen des PCR-Ansatzes soll 50 μ l betragen. Die Menge der Primer beträgt jeweils ca. 125 ng und die Menge an Plasmid kann zwischen 5-50 ng variiert werden. Außerdem werden noch 1 μ l eines 10 mM dNTP-Mixes und 5 μ l eines 10x Reaktionspuffers hinzugegeben. Die PCR wird durch Zugabe von 1 μ l *PfuTurbo* DNA Polymerase (2,5 U/ μ l) im Thermocycler

gestartet. Nach der PCR wird der Reaktionsansatz mit dem Enzym DpnI für eine Stunde bei 37 °C verdaut, wobei die Endonuklease das methylierte Elternplasmid verdaut und somit nur das mutierte Plasmid zurückbleibt. Nach Transformation in *E.coli* XL1-Blue *supercompetent cells* wird das mutierte Plasmid durch die Zellen zu einem Ring geschlossen und man hat das Plasmid mit der gewünschten Mutation vorliegen.

8.2.6 Durchführung einer PCR

Zur Durchführung einer PCR werden auf Eis die *Template* DNA, die Primer, der dNTP Mix, der Reaktionspuffer und die Polymerase zusammenpipettiert. Mit sterilem H₂O wird auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Das Gemisch wird kurz mit der Pipettenspitze vermischt und anschließend in den Thermocycler überführt. Es wird das folgende Temperaturprogramm für die Durchführung der PCR verwendet (siehe Abb. 101).

| Vorgang | Wiederholung |
|---|--------------|
| Denaturierung der <i>Template</i> -DNA für 30 s bei 95°C | 1x |
| Denaturierung für 30 s bei 95°C Annealing für 1 min bei 55°C Elongation für 12 min bei 68°C | 16x |
| Lagerung des PCR Produktes bei 6°C | 1x |

Abb. 101 Temperaturprogramm für die Durchführung einer PCR

8.2.7 Reinigung des PCR-Produktes

Bevor die PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen verdaut werden können, müssen diese aufgereinigt werden. Hierzu wird das *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma QIAGEN verwendet. Es werden zu 50 µl PCR Ansatz 250 µl Puffer PB gegeben. Die Zentrifugensäule wird in ein Sammeltube gestellt und die Lösung überführt. Nun wird für eine Minute bei 17.900 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Jetzt werden 750 µl Puffer PE zum Waschen zugesetzt und wieder für eine Minute bei 17.900 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und zum Trocknen wird nochmals bei 17.900 x g für eine Minute zentrifugiert. Die Säule wird in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und die DNA wird mit 50 µl Puffer EB eluiert, wobei nochmals für eine Minute bei 17.900 x g zentrifugiert wird.

8.2.8 Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen

Bevor das DNA-Fragment in den Expressionsvektor einligiert werden kann, müssen beide komplementäre Enden besitzen. Hierzu werden sie mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Bei einem Doppelverdau mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen ist darauf zu achten, dass ein Reaktionspuffer gewählt wird, bei dem beide Enzyme zu mindestens 70% aktiv sind. In den hier beschriebenen Experimenten wurde ein 60-facher Überschuss des Enzyms gewählt. Die Mengen der DNA-Fragmente und der Plasmide wurde mittels UV-Quantifizierung oder durch Abschätzung der Helligkeit der Banden auf dem Agarose-Gel im Vergleich zum Marker bestimmt.

Der Verdau wird in einem Heizblock bei 37°C für 2 Stunden durchgeführt. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgt durch 20 minütiges Erhitzen auf 80°C.

8.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung der DNA-Fragmente wird auf einem 1%igem Agarose Gel durchgeführt. Hierzu werden 0,7 g Agarose mit 70 ml 1x TAE-Puffer vermischt und in der Mikrowelle bis zum vollständigen Auflösen erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 40 °C bis 50 °C werden 2,5 µl Ethidiumbromid Stammlösung in die Lösung pipettiert und das Gel in einer Gießschale mit einem Probenkamm aushärten gelassen. Nach dem Aushärten wird das Gel in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die Proben werden im Verhältnis 1 zu 5 mit 6x *Loading Dye* versetzt. Nun wird der Probenkamm entfernt und die Proben werden in die entstandenen Taschen pipettiert. Zusätzlich wird zur Größen- und Mengenbestimmung ein Marker aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 140 V für 1,5 Stunden durchgeführt. Die Detektion der Banden erfolgt über die Fluoreszenz des Ethidiumbromids welches mit der DNA interkaliert.

8.2.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel

Die verdauten Plasmide werden auf ein Agarose-Gel aufgetragen um das ausgeschnittene DNA-Fragment vom geschnittenen Plasmid abzutrennen. Hierzu wird die entsprechende Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* nach den Vorgaben des Herstellers gereinigt. Die ausgeschnittene Bande wird in Eppendorfgefäß überführt, dessen Leergewicht bekannt ist. Nun wird das Gewicht des Gelfragments durch Differenzwägung bestimmt und pro 100 mg

Gelgewicht werden 300 µl Puffer QG zugefügt. Anschließend wird das Gemisch für 10 min auf 50°C erhitzt, so dass sich das Gel auflöst. Die Farbe der Lösung sollte nun gelb sein. Falls dies nicht der Fall sein sollte, wird der pH-Wert mit 10 µl Natriumacetat (3M, pH = 5) erniedrigt. Nun werden pro 100 mg Gel 100 µl Isopropanol zugegeben. Eine QIAquick Säule wird in ein Sammeltube gestellt und die Lösung überführt. Es wird für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Entfernen von Agaroseresten wird mit 500 µl Puffer QG gewaschen und eine Minute zentrifugiert. Nun wird noch mit 750 µl Puffer PE gewaschen und anschließend wird die Säule durch einminütige Zentrifugation bei 17.900 x g getrocknet. Die Säule wird in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und die Elution erfolgt mit 50 µl bzw. 30 µl Puffer EB.

8.2.11 Ligation

Die Ligation erfolgt mit einer T4-DNA-Ligase. Die Mengen der DNA-Fragmente und der Plasmide wird durch UV-Quantifizierung bestimmt. Es sollte ungefähr ein 3-4 facher molarer Konzentrationsüberschuss vom DNA-Fragment zu Plasmid vorliegen. Außerdem sollte die Menge an DNA-Ligase 1-2 U für *sticky ends* betragen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 22°C wird die Ligase durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C deaktiviert.

8.2.12 Darstellung hitzekompetenter Zellen

Es wird eine Übernachtskultur der entsprechenden Zellen angesetzt. Am nächsten Tag wird die Zellsuspension 1:100 mit frischem LB-Medium verdünnt (200 µl auf 20 ml) und für weitere 1-2 Stunden inkubiert bis die Lösung eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,2 bis 0,3 a.u. erreicht hat. Jetzt werden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Die Zellen werden bei 1000 x g für 20 min abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Das Zellpellet wird in 1 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert und zu je 100 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert, welche sofort in N_{2(l)} schockgefroren werden. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

8.2.13 Hitzetransformation

5 µl (bzw. 1µl bei *E. coli* XL1-Blue *supercompetent cells*) des Plasmids werden unter der Reinraumbank zu jeweils 100µl hitzekompetente Zellen (bzw. 50µl bei *E. coli* XL1-Blue *supercompetent cells*) gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit auf Eis folgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s (bzw. 45 s bei *E. coli* XL1-Blue *supercompetent cells*). Die Lösung wird wieder kurz auf Eis gestellt und anschließend wird 1 ml SOC-Medium

zugegeben. Nach einer Stunde Schütteln bei 37 °C werden jeweils 500µl der Lösung auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Agar-Platten werden schließlich bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

8.2.14 Darstellung elektrokompenter Zellen

500 ml LB-Medium werden mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft und im Schüttler bei 37 °C inkubiert bis eine Optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,35 a.u. erreicht ist. Zunächst werden die Zellen 10 min auf Eis gestellt und auch alle folgenden Schritte werden möglichst auf Eis durchgeführt. Nach Überführung in sterile Zentrifugenröhrchen werden die Zellen für 10 min bei 5.000 x g abzentrifugiert und das entstandene Zellpellet wird in 250 ml eisgekühltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Die letzten beiden Schritte werden nun wiederholt, wobei das Pellet jeweils in 100 ml, 50 ml, 10 ml und 1 ml eisgekühltem 10%igem Glycerin resuspendiert wird. Abschließend wird die Lösung zu je 100 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert, welche sofort in N_{2(l)} schockgefroren werden. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

8.2.15 Elektrotransformation

Alle Schritte werden auf Eis und unter der Reinraumbank durchgeführt. 4 µl der Plasmid-DNA werden in eine Elektrotransformationsküvette gegeben und anschließend mit 70 µl elektrokompenten Zellen überschichtet. Nach einer 2 minütigen Inkubationszeit wird die Küvette in ein Elektrotransformationsgerät gestellt und eine Spannung von 1,25 V angelegt. Nun wird 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium in die Küvette gegeben und die gesamte Lösung in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C im Schüttler wird die gesamte Lösung auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

8.3 Proteinchemische Methoden

8.3.1 Testexpression

Bevor die auf den Plasmiden kodierten Proteine im großen Maßstab exprimiert werden, wird eine Testexpression angesetzt. Hierfür werden 20 ml Kulturmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum in einem 100 ml Kolben mit 200 µl einer Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien werden im Schüttler bei 37 °C so lange inkubiert, bis sie eine optische Dichte (OD₆₀₀) von ca. 0,5-1,0 a.u. erreicht haben. Der verwendete Expressionsvektor besitzt ein *lac*-Operon. Durch Zugabe von 50 µl IPTG (200 mM), welches als permanenter Induktor wirkt,

kann die Expression gestartet werden. Nun wird stündlich eine 100 µl Probe entnommen. Zur Messung der optischen Dichte werden diese 1:10 mit Kulturmedium verdünnt um Sättigungseffekte aufgrund zu hoher Konzentration zu vermeiden. Nach der Messung werden die Proben abzentrifugiert und die Zellpellets dienen später zur Überprüfung der Testexpression mittels SDS-Gelelektrophorese.

8.3.2 Expression

Zur Expression der Proteine im größeren Maßstab wird eine Übernachtskultur des entsprechenden Expressionsstammes angesetzt. Am nächsten Tag werden vier 2 l Kolben mit jeweils 500 ml Kulturmedium und dem entsprechenden Antibiotikum mit jeweils 5 ml Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien werden im Schüttler bei 37 °C so lange inkubiert, bis sie eine optische Dichte (OD_{600}) von ca. 0,5-1,0 a.u. erreicht haben. Durch Zugabe von jeweils 1,25 ml IPTG (200mM) kann die Expression gestartet werden. Zur Überprüfung des Zellwachstums werden stündlich Proben entnommen, deren optische Dichte (OD_{600}) 1:10 verdünnt gemessen wird. Anschließend werden die Zellen dieser Proben für eine Überprüfung der Expression mittels SDS-Gelelektrophorese abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert. Während die Proteinexpression von unmarkiertem Probenmaterial in LB-Medium mit 0,2 % Glucose als Kulturmedium durchgeführt wird, wird für die uniforme ^{15}N -Markierung von Proteinen folgendes definiertes Minimalmedium verwendet (siehe Abb. 102) [213], welches $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als einzige Stickstoffquelle besitzt.

| Komponente | Menge |
|-----------------------------|---|
| M9-Medium | 930 ml |
| Vitamin-Mix | 10 ml |
| Spurenelement-Mix | 10 ml |
| MgCl_2 (1M) | 10 ml |
| Thiamin (5 mg/ml) | 6 ml |
| Glucose (20 %) | 25 ml |
| Kan50 | 1 ml |
| $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ | 1 g (aufgelöst in 8 ml H_2O und sterilfiltriert) |

Abb. 102 **Minimalmedium für die Expression Isotopen-markierter Proteine**
Zusammensetzung verändert übernommen aus [213]

Für die Expression von uniform ^{15}N - und ^{13}C -markierter Proteine wird ebenfalls dieses Minimalmedium verwendet, wobei in diesem Fall die 20%ige Glucose Lösung durch ^{13}C -Glucose in einer Konzentration von 2g/l ersetzt wird.

Zur selektiven Markierung einzelner Aminosäuren wird dieses Minimalmedium mit $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ verwendet und 30 min vor der Induktion wird ein frisch autoklavierter, auf 37 °C abgekühlter Aminosäuremix zugegeben, welcher neben der betreffenden ^{15}N -markierten Aminosäure auch alle weiteren Aminosäuren in unmarkierter Form enthält (siehe Abb. 103). Die Zellen verwenden nun bevorzugt die im Medium vorliegenden Aminosäuren für die Proteinbiosynthese. Zur Vermeidung von *scrambling*, womit man die biosynthetische Umwandlung der markierten Aminosäure in andere bezeichnet, wird die Expressionsdauer auf 4 Stunden verkürzt.

| Selektive Markierung | 100 mg/l | 500 mg/l | 300 mg/l | 200 mg/l |
|----------------------|----------------------|----------|--|-----------------------|
| Ala | ^{15}N -Ala | Asp, Glu | Leu, Ile, Val | restliche Aminosäuren |
| Leu | ^{15}N -Leu | Asp, Glu | Ala, Ile, Val | restliche Aminosäuren |
| Ile | ^{15}N -Ile | Asp, Glu | Ala, Leu, Val, Thr | restliche Aminosäuren |
| Val | ^{15}N -Val | Asp, Glu | Ala, Leu, Ile | restliche Aminosäuren |
| Phe | ^{15}N -Phe | Asp, Glu | Ala, Leu, Ile, Val, Tyr, Trp, Ser, Gly | restliche Aminosäuren |

Abb. 103 Aminosäuremix für selektive ^{15}N -Markierung von Proteinen

8.3.3 Zellaufschluss mit der French-Press

Beim Zellaufschluss mit Hilfe der French-Press werden die Zellen einem hohen Druck von ca. 15.000 psi (1034 bar) ausgesetzt und anschließend wird der Druck durch Öffnen einer Ventilschraube schlagartig erniedrigt. Durch die plötzliche Druckentspannung zerplatzen die Zellen. Die abzentrifugierten Zellen nach der Expression werden in 10 bis 30 ml HisTrap Binding-Puffer resuspendiert. Nun werden pro 10 ml Aufschlussvolumen 100 μl Pefabloc (20 mM), 100 μl Benzamidin (478,8 mM), 100 μl PMSF (100 mM) als Proteaseinhibitoren

und 5 µl Benzonase zum Schneiden der DNA hinzugefügt. Die Lösung wird in einen Metallzylinder überführt und der Druck mit einer hydraulischen Presse auf 15.000 psi erhöht. Durch Öffnen der Ventilschraube wird der Druck erniedrigt und die Zellsuspension wird aus dem Zylinder herausgedrückt. Zur vollständigen Lyse wird der Vorgang drei- bis viermal wiederholt.

8.3.4 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Alternativ zum Aufschluss mit der French-Press kann die mit Proteaseinhibitoren versetzte Zellsuspension in HisTrap Binding-Puffer auch mittels Ultraschall aufgeschlossen werden. Hierzu werden der Lösung noch zusätzlich Lysozym (50 µg/ml) zur Verbesserung des Aufschlusses zugesetzt. Die Lösung wird unter intensiver Eiskühlung in Intervallen von jeweils drei Minuten mit einem Ultraschallfinger bei 65 % Leistung sonifiziert. Zwischen den Intervallen ist eine ausreichend lange Pause einzulegen, um eine zu starke Erwärmung der Lösung zu vermeiden. Durch die Ultraschallbehandlung zerplatzen die Zellen, wodurch sich die Suspension aufhellt. Der Vorgang wird solange wiederholt bis eine deutliche Aufhellung zu erkennen ist.

8.3.5 Lokalisation des Proteins

Nach dem Zellaufschluss werden die Zelltrümmer und eventuell gebildete *inclusion bodies* für 15 min bei 3.000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wird abgetrennt und in HisTrap Binding-Puffer mit 2 % NLS solubilisiert. Der Überstand wird zum Abtrennen der Membranen für eine Stunde bei 150.000 x g in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Membranpellet wird ebenfalls abgetrennt und in HisTrap Binding Puffer mit 2 % NLS solubilisiert. Der Überstand nach der Ultrazentrifugation enthält alle löslichen Proteine (Zellplasma-Fraktion). Aus der Zellplasma-Fraktion, der Zelltrümmer-Fraktion und der Membran-Fraktion werden Proben für eine SDS-PAGE entnommen um das exprimierte Protein lokalisieren zu können.

8.3.6 Aufkonzentration von Proteinlösungen

Die Aufkonzentration von Proteinlösungen erfolgt mit der Rührzelle *Omega Cell* der Firma Pall. Hierzu wird die Proteinlösung (bis 150 ml) in eine Rührzelle mit passendem MWCO (*Molecular Weight Cut Off*) überführt. Nun wird die Druckkappe mit dem Rührer auf die Rührzelle aufgeschraubt und auf einen Magnetrührer gestellt. Mit Hilfe von N₂ wird ein

Druck von ca. 3 bar eingestellt und der Magnetrührer eingeschaltet. Durch den Druck wird die Lösung durch die Membran gepresst, wohingegen die Proteine aufgrund ihrer Größe die Membran nicht passieren können. Das ständige Rühren verhindert ein Verstopfen der Membran, da die Proteine hierdurch immer wieder aufgewirbelt werden. Der Durchfluss wird in einem Becherglas aufgefangen. Sobald das gewünschte Volumen erreicht ist, wird der Druck abgelassen und die Lösung noch 5 Minuten weiter gerührt. Anschliessend kann die Lösung aus der Rührzelle herauspipettiert werden.

Die Rührzelle wird gereinigt, indem man eine 0,5 M NaOH-Lösung für ca. 30 Minuten rührt. Anschließend wird die Membran mit bidest. H₂O gewaschen und in 0,05 M NaOH-Lösung gelagert.

8.3.7 Dialyse

Vor der Bromcyan-Spaltung und am Ende der Aufreinigung muss das Protein zur Entfernung des Detergenzes und der Puffersubstanzen dialysiert werden. Die Proteinlösung wird hierzu in einen *Spectra/Por 6* Dialyseschlauch mit passenden MWCO überführt und für bis zu zwei Wochen gegen 5 l H₂O unter mehrmaligem Wasserwechsel dialysiert. Dabei fallen die Proteine TatA₂₋₇₀ und TatA₂₋₄₅ als weißer Feststoff aus und können nach der Dialyse abzentrifugiert werden.

8.3.8 Bromcyanspaltung

Zur Entfernung des His-Tag, welcher die Aufreinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie erleichtert, wird eine Bromcyanspaltung durchgeführt. Bromcyan spaltet C-terminal von Methionin, wodurch das erste Methionin zusammen mit dem His-Tag abgetrennt wird. Das Protein wird in ca. 2 ml H₂O und 2 ml TFA aufgelöst. Nun werden im Abzug drei Mikrospatelspitzen Bromcyan zugegeben (Vorsicht: sehr giftig). Die Lösung wird über Nacht im abgedunkelten Abzug gerührt und am nächsten Morgen werden 20 ml H₂O zugegeben. Anschließend wird die Lösung bei -80 °C eingefroren und lyophilisiert.

8.4 Chromatographische Methoden

8.4.1 Nickel-Affinitätschromatographie

Die in dieser Arbeit dargestellten Proteine werden als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Hexahistidin-Tag (His-Tag) exprimiert. Hierdurch wird eine Reinigung über eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographiesäule möglich, da das Histidin an die an der Säule

immobilisierten Ni²⁺-Ionen binden kann. Das aufzureinigende Protein kann so selektiv an die Säule gebunden werden und später durch Erhöhung der Imidazol-Konzentration wieder eluiert werden.

Die Aufreinigung erfolgt über eine HisTrap FF Affinitätschromatographiesäule nach den Angaben des Herstellers an einem ÄKTApurifier Chromatographiesystem. Alle verwendeten Lösungen werden filtriert und die Flussrate beträgt 5 ml/min. Vor jeder Aufreinigung eines neuen Proteins wird die Säule durch Spülen mit 5-10 Säulenvolumen Stripping-Puffer „gestrippt“, wobei die Nickel-Ionen durch das EDTA komplexiert und von der Säule gespült werden. Dann wird die Säule mit 5-10 Säulenvolumen Binding-Puffer und mit 5-10 Säulenvolumen bidest. H₂O gespült um anschließend mit einer 0,1 M NiSO₄-Lösung wieder neu beladen zu werden.

Bevor die Probe aufgetragen werden kann, wird die Säule nochmals mit 5 Säulenvolumen bidest. H₂O und 10 Säulenvolumen Binding-Puffer gespült. Da in dieser Arbeit Fragmente eines Membranproteins aufgereinigt wurden, wurden alle verwendeten Puffer mit 0,1 % NLS versetzt, damit das Protein nicht auf der Säule präzipitiert. Die Proteinlösungen der Membran-Zelltrümmer- und Zellplasmafraktion werden vor dem Auftragen noch für 30 min bei 10.000 x g zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Anschließend wird die Probe über eine Probenschleife aufgetragen. Die Detektion erfolgt über ein Photometer bei 280 nm und außerdem kann die Leitfähigkeit detektiert werden. Der Fraktionssammler sammelt beim Probenauftragen und Nachspülen 50 ml in einer Fraktion und bei der Elution wird die Fraktionsgröße auf 10 ml verringert. Nach dem Auftragen der Probe wird solange mit Binding-Puffer gespült bis die Absorption wieder bei der Nulllinie angelangt ist. Hierbei werden alle Proteine, die nicht an die Säule binden, heruntergespült. Eine 20 mM Konzentration von Imidazol im Binding-Puffer verhindert die unspezifische Bindung von anderen Proteinen. Zur Elution der gebundenen Proteine wird anschließend mit Elutions-Puffer gespült, welcher eine hohe Imidazolkonzentration enthält und somit das Protein von der Säule verdrängt.

Neben dieser Aufreinigung des Rohextraktes wird nach der Bromcyan-Spaltung auch noch eine subtraktive Ni²⁺-Affinitätschromatographie durchgeführt, wobei das ungespaltene Protein an die Säule bindet und sich das gespaltene Protein ohne His-Tag im Durchfluss befindet.

Zur Lagerung wird die Säule erst mit bidest. H₂O und anschließend mit 20%igem Ethanol gespült.

8.4.2 Gelfiltrationschromatographie

Für den Fall, dass die TatA_d-Fragmente nach der Aufreinigung über die Ni²⁺-Affinitätschromatographie noch eine Verunreinigung aufweisen, wird noch eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Bei der Gelfiltration erfolgt eine Trennung aufgrund der Proteingröße. Kleine Moleküle wandern durch die Poren des Gels und eluieren somit später als größere, da diese um die Poren herumwandern können. Alle Lösungen werden zuvor filtriert und anschließend entgast. Da die TatA_d-Fragmente in einer NLS-Mizelle vorliegen wird eine Säule mit entsprechendem großem Trennbereich gewählt. Die HiLoad 26/60 Superdex 200 pg Säule (320 ml Säulenvolumen, Trennbereich 10-600 kDa) wird zu Beginn mit ca. 600 ml Gelsäulenlaufpuffer (mit 0,2 % NLS) über Nacht mit einer Flussrate von 0,6 ml/min äquilibriert. Die Probe wird auf 10 ml eingengt, filtriert und mit Hilfe einer Probenschleife auf die Säule aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei einem isokratischen Fluß von 2 ml/min, wobei die Absorption bei 280 nm gemessen wird und die Fraktionen auf Zeitbasis gesammelt werden. Die Fraktionen werden mittels SDS-PAGE auf Quantität und Reinheit des Proteins überprüft. Nach der Proteintrennung wird die Säule mit bidest. H₂O und zur Konservierung anschließend mit 600 ml NaN₃-Lösung (0,05 %) gespült.

8.5 Analytik

8.5.1 UV-Quantifizierung

Zur Mengenbestimmung von Plasmiden wird die UV-Absorption bei 260 nm gemessen, weshalb für UV-Licht durchlässige Küvetten verwendet werden müssen. Enthält eine Probe 50 µg/ml doppelsträngige DNA so ergibt sich bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm eine Absorption bei 260 nm von 1,0. Die Plasmidkonzentration ergibt sich demnach aus folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \times A_{260}$$

Es wird das Programm DNA/RNA im Photometer gewählt und ein Nullabgleich mit der Pufferlösung durchgeführt. Anschließend wird die Absorption der Probe bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Messung der Absorption bei 280 nm dient zur Abschätzung der Reinheit der DNA, da beispielsweise Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen. Für eine hohe Reinheit sollte der Quotient aus A₂₆₀ und A₂₈₀ zwischen 1,8 und 2 liegen.

8.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung der Proben auf Proteingehalt und Reinheit wird eine SDS-PAGE vorgenommen. Die Elektrophorese wird in einer Mini-Protean Tetra Cell Kammer der Firma Bio-Rad durchgeführt. Zur Trennung wird ein 16 %iges Tris-Tricin-Gel verwendet:

| Trenngel (2 Gele) | Sammelgel (2 Gele) |
|-------------------------|-----------------------------|
| 5,2 ml 30 % Acrylamid | 670 µl 30 % Acrylamid |
| 3,3 ml Tris-Cl-Puffer | 1,29 ml 4 x Tris-HCl-Puffer |
| 1,7 ml 87 % Glycerin | - |
| 400 µl H ₂ O | 3,2 ml H ₂ O |
| 70 µl 10 % APS | 35 µl 10 % APS |
| 3,5 µl TEMED | 2 µl TEMED |

Abb. 104 **Zusammensetzung des Polyacrylamidgels**

In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen werden alle Komponenten zusammengegeben und durch Zugabe von APS wird die Polymerisation gestartet. Das Trenngel wird schnell zwischen die Glasplatten pipettiert und mit H₂O überschichtet. Nach dem Aushärten wird das H₂O abgegossen und das Sammelgel darüber gegeben, wobei das APS wieder erst kurz vor dem Gießen hinzu gegeben wird. Außerdem wird ein Probenkamm zum Ausbilden der Probestaschen eingesetzt.

Die Proben werden 1:1 mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt. Die Menge des 2x SDS-Ladepuffers für die Expressionsreihen errechnet sich wie folgt:

$$\frac{OD_{600}}{0,2} \cdot 7,5 = x \text{ µl } 2x \text{ SDS - Ladepuffer}$$

Anschließend werden die Proben für mind. 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Probestaschen werden mit den Proben beladen und ein Proteinmarker wird zur Molekulargewichtsbestimmung aufgetragen. Nun wird das Gel in die Elektrophorese-Kammer gestellt und der Anoden- und Kathodenpuffer eingefüllt. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von ca. 30 mA und einer Anfangsspannung von 100 V durchgeführt. Die SDS-Moleküle denaturieren die Proteine und lagern sich an diese an wodurch eine gleichmäßige negative Ladung aller Proteine hervorgerufen wird. Die Wanderungsstrecke ist demnach proportional zur Größe des Proteins, wobei kleine Moleküle schneller durch das engmaschige Gel laufen. Die Elektrophorese wird gestoppt sobald der

blaue Farbstoff (Bromphenolblau) des SDS-Ladepuffers die Unterkante des Gels erreicht hat. Nun wird das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wird für 10 min in Fixierlösung und anschließend für ca. 60 min in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Nach dem Entfärben in Entfärber-Lösung sind die Proteinbanden sichtbar. Das Gel wird zur Dokumentation photographiert und gespeichert.

8.5.3 Western-Blot

Zum Nachweis des His-Tag Fusionsproteins wird ein Western-Blot mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Bei dem hier beschriebenen Anti-His-Tag Western-Blot werden ein Primär- und ein Sekundärantikörper benötigt. Der Primärantikörper bindet an den His-Tag und der Sekundärantikörper ist gegen den ersten Antikörper gerichtet und mit einer Peroxidase gekoppelt.

Primärantikörper: Anti-His-mAB

Sekundärantikörper: Anti-Mouse IgG HRP

Die Proben werden auf einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Sammelgel entfernt und verworfen. Die auf dem Trenngel befindlichen Proteine werden elektrophoretisch auf einen Nitrocellulosefilter transferiert. Hierzu wird ein Sandwich aus Filterpapieren hergestellt, welche zuvor auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten werden müssen (8 cm x 6 cm):

1. 6 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer I
2. 3 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer II
3. Nitrocellulosemembranfilter mit Anodenpuffer II
4. SDS-Gel mit Kathodenpuffer
5. 9 Lagen mit Kathodenpuffer

Das Sandwich wird in der Blotting-Apparatur so platziert, dass der Nitrocellulosefilter zur Anode hin orientiert ist. Die Filterpapiere werden zusammengedrückt und die Blotting-Apparatur wird gleichmäßig zusammengeschraubt. Es wird 50 min mit einer Stromstärke von 2 mA/cm² geblottet. Anschließend wird das Gel in Coomassie-Lösung angefärbt, um zu überprüfen, ob der Blot erfolgreich war. Die Membran wird in 20 ml PBS-*blocking* Puffer für 1 Stunde geschüttelt, wobei die freien freien Koordinationsstellen besetzt werden. Nun wird dreimal 5 min mit 20 ml PBS-Tween gewaschen und anschließend wird der Primärantikörper

auf die Membran gegeben und für 1 Stunde geschüttelt. Jetzt wird wieder dreimal 5 min mit 20 ml PBS-Tween Puffer gewaschen und dann wird der Sekundärantikörper auf die Membran gegeben und für 45 min geschüttelt. Danach wird zweimal 1 min mit 20 ml PBS-Tween Puffer und zweimal 1 min mit 20 ml PBS-Puffer gewaschen. Abschließend wird die Membran in 20 ml PBS-Puffer gegeben. Es werden 200 μl Chloronaphtol und 20 μl H_2O_2 (30 %) hinzugefügt und solange geschüttelt bis die Banden sichtbar werden. Danach wird noch dreimal mit 20 ml bidest. H_2O gewaschen.

8.5.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zur Messung eines MALDI-TOF-Massenspektrums (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight*) wird eine kleine Menge der Probe in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nun werden 5 μl der Matrix-Lösung (gesättigte 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Acetonitril/Wasser (1:2) mit 0,1 % TFA) hinzugegeben und für 5 min bei 3.000 x g zentrifugiert. Anschließend wird 1 μl der Probe auf die MALDI Proben-Platte (*Target*) aufgetragen und trocknen gelassen. Beim Trocknen kommt es zur Kokristallisation der Probe und der Matrix. Durch eine MALDI-TOF Messung kann das Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z -Verhältnis) eines Analyts bestimmt werden. Die MALDI-Methode stellt eine besonders schonende Ionisierungstechnik dar, welche aus diesem Grund sehr gut für Proteine geeignet ist. Die kokristallisierte Probe wird mit einem Laserstrahl beschossen, wobei die Matrix-Moleküle verdampfen und die Analytmoleküle mitgerissen werden. Hierbei werden diese desorbiert und ionisiert ohne einer Fragmentierung zu unterliegen. Der ionisierte Analyt wird nun in einem elektrischen Feld im Hochvakuum beschleunigt und anschließend seine Flugzeit gemessen. Diese ist proportional zu seinem Masse/Ladungs-Verhältnis. Die Messungen wurden von Dr. Sergii Afonin (KIT Karlsruhe) an einem MALDI-TOF-Massenspektrometer der Firma Bruker durchgeführt.

Zur Reinigung des *Targets* verwendet man ein Gemisch aus Ameisensäure, Wasser und Methanol (1:1:1). Das Target wird in der Reinigungslösung für 20 min im Ultraschallbad beschallt. Anschließend wird das *Target* mit Methanol abgespült und getrocknet.

8.5.5 CD-Spektroskopie

Bei der CD-Messung von Membranproteinen ist es wichtig das Protein in eine Membran-imitierende Umgebung zu bringen. Hierzu eignen sich zum Beispiel Mizellen oder Lipidvesikel.

Die Rekonstitution erfolgt je nach Fragment unter unterschiedlichen Bedingungen, wobei das Protein/Lipidverhältnis bei 1:100 liegt.

- **TatA₂₂₋₇₀**

Das lösliche Fragment TatA₂₂₋₇₀ kann direkt zu vorgefertigten Lipidvesikeln gegeben werden.

- **TatA₁₋₂₇ und TatA₂₋₇₀**

Das Protein und die Lipide werden in detergenzhaltiger Lösung kosolubilisiert. Anschließend wird das Detergenz (NLS) durch *BioBeads* entfernt, wobei sich die Lipidvesikel bilden. Hierzu wird die Lösung bei 35 °C mit Hilfe eines Minirührfisches gerührt und stündlich ein Spatel *BioBeads* zugegeben. Nach vier Stunden wird die Lösung abpipettiert und durch Glaswolle filtriert. Vor der Verwendung müssen die *BioBeads* zweimal mit Methanol und anschließend dreimal mit bidest. H₂O gewaschen werden.

- **TatA₂₋₄₅ und TatA₂₂₋₄₅**

Das Protein und die Lipide werden in Chloroform/Methanol (1:1) kosolubilisiert. Anschließend wird das organische Lösungsmittel im N₂-Strom abgedampft und etwaige Reste des Lösungsmittels werden über Nacht unter vermindertem Druck entfernt. Der zurückbleibende Lipidfilm wird mit Wasser aufgenommen und durch Behandlung mit Ultraschall bilden sich *Small Unilamellar Vesicles* (SUV's).

Die Proben werden in eine 250 µl Quarzglasküvette mit 1 mm Schichtdicke gegeben. Die Konzentration der Lösung wird durch Verdünnen mit H₂O an das erhaltene CD-Signal angepasst, wobei sich eine Proteinendkonzentration von 0,125-0,25 mg/ml als optimal erwiesen hat. Die CD-Spektren werden bei 30 °C in einem Jasco J-810 Spektropolarimeter von 260-180 nm in 0,1 nm Intervallen aufgenommen. Von jeder Probe werden drei Messungen mit einer Scangeschwindigkeit von 10 nm/min, 4 s *response time* und einer 1 nm Bandbreite gemittelt. Ebenso wird ein Referenzspektrum der Matrix ohne Protein aufgenommen und von dem Probenspektrum abgezogen. Da von TatA aufgrund des Fehlens von Tyrosin und Tryptophan keine UV-Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden kann und colorimetrische Proteinmengenbestimmungsmethoden nicht genau genug sind, können keine *mean residue ellipticities* berechnet werden. Deshalb werden die Spektren normiert und zur Auswertung wird ein qualitativer Vergleich mit den CD-Basispektren (vergleiche Abb. 9) vorgenommen.

8.5.6 Orientierte CD-Spektroskopie

Für die OCD-Spektroskopie müssen die Proben in orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituiert werden. Die Darstellung der Vesikellösungen erfolgt analog zu der Probenvorbereitung der CD-Proben. Nur die Rekonstitution des Proteins TatA₂₂₋₄₅ wurde diesmal mit einem Protein/Lipidverhältnis von 1:50 durchgeführt, da dieses Fragment mit kleineren Proteinkonzentrationen keine guten Spektren ergab. Außerdem wurde dieses Protein im Gegensatz zur CD-Probe zusammen mit dem Lipid in detergentzhaltiger Lösung kosolubilisiert und das Detergenz anschließend durch *Biobeads* entfernt.

Ein 50 - 100 µl Aliquot, welches eine Gesamtproteinmenge von ca. 15 - 25 µg und ca. 0,2 mg Lipid enthält, wird mit einer Hamiltonspritze auf einen Quarzglasprobenträger mit 20 mm Durchmesser (Suprasil QS, Hellma Optik, Jena) aufgetragen. Der Tropfendurchmesser sollte hierbei ca. 9 - 12 mm betragen. Die an der Luft getrocknete Probe wird anschließend im Exsikkator-Vakuum bei ~2 mbar für 4 Stunden weiter getrocknet. Die Glasplatte mit der getrockneten Probe wird danach in die OCD-Messzelle [153] eingebaut und über Nacht definiert befeuchtet (97% rH, gesättigte K₂SO₄-Lsg., T = 304 K), wozu ein 300-500 µl Aliquot der K₂SO₄-Lösung in die Ringkammer der Messzelle gegeben wird. Die Lipid-Referenzprobe wird gleichermaßen dargestellt. Es ist zu beachten, dass neben der Lipidmenge auch die Tropfengröße bzw. der Durchmesser des Protein/Lipid-Flecks bei Probe und Referenz möglichst identisch sind.

Die Messzelle wird in das Jasco J-810 Spektropolarimeter eingebaut und das OCD-Spektrum mit den gleichen Parametern wie die CD-Spektren aufgenommen. Anschließend wird durch Rotation der OCD-Probenkammer senkrecht zum Lichtstrahl um jeweils 45° ein weiteres Spektrum aufgenommen, wodurch sich insgesamt acht Spektren ergeben. Diese werden nun gemittelt um mögliche Effekte durch Lineardichroismus und Doppelbrechung abzuschwächen. Außerdem wird wieder das Lipid-Referenzspektrum als Hintergrund abgezogen.

8.5.7 Festkörper-NMR Spektroskopie

Für die Festkörper-NMR Messungen wird das Protein entweder in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen oder in Bizellen rekonstituiert.

- **Rekonstitution in Bizellen**

Zur Rekonstitution des Proteins TatA₂₋₄₅ in Bizellen werden als langkettige Lipide entweder reines DMPC oder ein Gemisch aus DMPC und DMPG im Verhältnis 80 zu 20 verwendet. Als kurzkettiges Lipid findet das etherverknüpfte 6-O-PC Anwendung, um die Stabilität der Bizellen zu erhöhen. Es wird ein Molverhältnis von lang- zu kurzkettigen Lipiden von $q = 3,2$ eingestellt und die Gesamtlipidmenge beträgt 56 mg. Zur Probendarstellung wird die entsprechende Menge der langkettigen Lipide als Pulver abgewogen und das kurzkettige Lipid wird aufgrund seiner Hygroskopizität als wässrige Stammlösung hinzugegeben. Das Gemisch wird mit bidest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 256 μ l aufgefüllt und intensiv mit einem Vortexer vermischt. Die Probe wird abwechselnd bei 0 °C und 43 °C inkubiert bis eine klare Lösung entsteht. Bizellen sind bei Temperaturen über 35 °C viskos und nur bei tiefen Temperaturen dünnflüssig, weshalb der pH-Wert von 6,8 auf Eis eingestellt wird. Es werden 170 μ l dieser Lösung in der Kühlzelle mit einer vorgekühlten Pipettenspitze zu ¹⁵N-TatA₂₋₄₅ gegeben, wobei die Proteinmenge so gewählt wird, dass sich ein Protein/Lipid Verhältnis von 1:100 ergibt. Dieses Gemisch wird nun wieder intensiv mit dem Vortexer vermischt und abwechselnd bei 0 °C und 43 °C inkubiert bis sich das gesamte Protein gelöst hat. Nun wird nochmals der pH-Wert überprüft und die Lösung in ein NMR-Probengefäß überführt, welches luftblasenfrei mit einem Gummistopfen verschlossen und mit Parafilm versiegelt wird.

- **Rekonstitution in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen**

Zur Darstellung von mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen, wie sie beispielsweise für das Konstrukt TatA₂₂₋₄₅ Anwendung fanden, werden die Lipide DMPC und DMPG als Pulver abgewogen (19,8 mg Gesamtlipidmenge). Für das Protein TatA₂₂₋₄₅ wurde ein DMPC/DMPG Verhältnis von 30 : 70 gewählt, da sich das Fragment bei einem höheren Anteil negativ geladener Lipide besser orientierte. Außerdem wurde ein größeres Protein/Lipid Verhältnis von 1:25 angewendet, da sich aufgrund der kleineren molaren Masse und der geringeren Lipidmenge im Vergleich zu Bizellen-Proben ansonsten ein zu schlechtes Signal zu Rausch Verhältnis ergab. Die abgewogenen Lipide werden in Chloroform/Methanol in einem Eppendorfgefäß aufgelöst und anschließend wird das organische Lösungsmittel wieder im N₂-Strom abgedampft, so dass sich ein Lipidfilm am Rand des Eppendorfgefäßes ausbildet. Dieser Lipidfilm wird über Nacht unter vermindertem Druck gelagert um Reste des Lösungsmittels zu entfernen. Anschließend wird er wieder mit bidest. H₂O aufgenommen und durch Behandlung dieser Lösung mit Ultraschall bilden sich *Small Unilamellar Vesicles*

(SUV's) aus. Zu dieser Vesikel-Lösung wird nun das lösliche TatA₂₂₋₄₅ als lyophilisiertes Pulver gegeben. Die Lösung wird für 30 min bei 37 °C inkubiert und danach gleichmäßig auf 22 Glasplättchen (7,5 x 12 mm) verteilt. Nach dem Trocknen werden diese gestapelt und bei 48 °C mit einer gesättigten K₂SO₄-Lösung (97 % rH) über Nacht rehydratisiert, wobei sich die orientierten Lipiddoppelschichten ausbilden. Der Glasstapel wird danach in einen Glascontainer (7,7 x 2,2 x 30 mm) transferiert und um ein Austrocknen zu vermeiden wird ein Wasserreservoir (Papier getränkt mit 75 µl H₂O) hinzugefügt und die Öffnung mit Parafilm versiegelt.

- **Festkörper-NMR Messungen**

Die Messungen werden mit einem Bruker HXY Probenkopf ausgestattet mit einer 5 mm Solenoid-Rundspule für Bizellen bzw. einer Flachspule für die Messung orientierter Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen auf einem Bruker 500 MHz Spektrometer durchgeführt. Alle Spektren werden in der ¹⁵N-Dimension auf 26,8 ppm für festes ¹⁵NH₄SO₄ referenziert, was einer Referenzierung auf 0 ppm für flüssigen Ammoniak entspricht. Die ¹H-Dimension wird auf 4,7 ppm für H₂O bei 42 °C referenziert. Die Feldhomogenität wird an der Wasserlinie optimiert.

Vor jeder ¹⁵N-NMR-Messung werden die Qualität der Rekonstitution und die Orientierung der Membran-imitierenden Umgebung mit einem ³¹P-NMR-Spektrum überprüft. Das 1D-¹⁵N-NMR-Spektrum wird mit Kreuzpolarization aufgenommen, wobei die CP-MOIST Pulssequenz Anwendung findet [214]. Während der Akquisition wird mit der SPINAL-16 Pulssequenz und einer Feldstärke von 30 kHz heteronuklear ¹H entkoppelt [215, 216]. Eine 1 ms CP-Kontaktzeit und ein *recycle delay* von 6-8 s zwischen den *scans* zur Vermeidung der Probenaufheizung wird sowohl in den 1D-Experimenten als auch in den, im folgendem beschriebenen, 2D-Experimenten verwendet.

Für die ¹⁵N-chemische Verschiebung/¹H-¹⁵N dipolare Kopplung Korrelationsexperimente wird das SAMMY-Experiment [161] mit der verbesserten SAMPI4 Pulssequenz verwendet [160]. Die Hartmann-Hahn Bedingung und die ¹H-Pulslänge (hot 90°) werden direkt an der Probe bestimmt. Die Protonen *carrier*-Frequenz wird auf 9 ppm gesetzt und die ¹⁵N *carrier*-Frequenz wird für ungeflippte Bizellen auf 80 ppm, für geflippte Bizellen auf 150 ppm und für TatA₂₂₋₄₅ in mechanisch orientierten Doppelschichten auf Glasplättchen auf 110 ppm gesetzt. Es wird eine ¹H-B₁-Feldstärke von 51 kHz verwendet und während der 10 ms Acquisitionszeit wird mit einer 30 kHz Feldstärke entkoppelt. Die erhaltenen FID's werden *zero-filled* und die ¹H-¹⁵N-dipolare Kopplungsdimension wird skaliert wie in [160]

beschrieben. Für Prozessierung und Visualisierung der Daten werden die Programme NMRpipe [212], Sparky [211] und Topspin (Bruker Biospin) verwendet.

Zur Bestimmung des Tiltwinkels τ , des Ordnungsparamertes S und des Rotationswinkels ρ werden simulierte PISEMA Spektren berechnet, welche mit den experimentell erhaltenen Spektren verglichen werden. Die Simulation von PISA-*wheels* wird mit dem Programm opisawheel (Dr. Stephan Grage, KIT Karlsruhe) durchgeführt. Alle Simulationen wurden für eine ideale α -Helix mit uniformen dihedralen Winkeln ($\Phi = -60.7^\circ$; $\Psi = -44.7^\circ$), uniformen chemischen Verschiebungshauptachsenelementen ($\sigma_{11N} = 64$ ppm; $\sigma_{22N} = 77$ ppm; $\sigma_{33N} = 222$ ppm), einer NH-Bindungslänge von 1,07 Å und einem uniformen Winkel von $\delta = 18,5^\circ$ zwischen dem NH-Bindungsvektor und der Tensorhauptachse σ_{33N} [198, 199] durchgeführt.

Zur Erstellung von Molekülbildern wird die Software PyMol verwendet [200].

8.5.8 Flüssigkeits-NMR Spektroskopie

Für die Flüssigkeits-NMR Spektroskopie müssen die hydrophoben Membranproteine in Lösung gebracht werden. Hierzu werden sie in Detergenz-Mizellen oder isotropen Bizellen rekonstituiert.

- **Rekonstitution in Detergenz-Mizellen**

0,25-1 mM des lyophilisierten Proteins und 450 mM SDS-d25 werden abgewogen. Nun werden 50 μ l D₂O und 50 μ l 0,5 M NaPi (pH = 6,0) zu dem Pulver gegeben und das Gemisch mit bidest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l aufgefüllt. Die Mischung wird mit dem Vortexer geschüttelt, bei 43°C inkubiert und mit Ultraschall behandelt bis sich das gesamte Protein aufgelöst hat. Abschließend wird die Lösung in ein NMR-Probenröhrchen überführt.

- **Rekonstitution in isotropen Bizellen**

0,5-1 mM des lyophilisierten Proteins, 60 mM DMPC-d54 und 240 mM DHPC (q = 0,25) werden abgewogen. Die weitere Probenvorbereitung erfolgt analog zur Rekonstitution in Detergenz-Mizellen.

- **D₂O-Austausch**

Die Probe wird zuerst in H₂O dargestellt und ein HSQC-Spektrum aufgenommen. Anschließend wird die Probe in ein Eppendorfgefäß überführt und lyophilisiert. Der Rückstand wird mit D₂O aufgenommen und auf dem Vortexer geschüttelt, bei 43°C inkubiert

und mit Ultraschall behandelt bis sich das gesamte Protein gelöst hat. Abschließend wird die Probe in NMR-Probenröhrchen überführt.

- **Flüssigkeits-NMR Messungen**

Die Flüssigkeits-NMR Messungen wurden größtenteils von Dr. Claudia Muhle-Goll (KIT Karlsruhe) durchgeführt. Die Flüssigkeits-NMR Experimente wurden an einem Bruker Avance 600 MHz Spektrometer bei 50 °C aufgenommen. Zu Beginn der Messung wird die Feldhomogenität optimiert (*shimmen*). Die Protoneneinstrahlfrequenz wird auf die Resonanz der Wasserlinie gesetzt, um diese zu unterdrücken und die Protonen- und Stickstoffpulslängen werden bestimmt. Die Prozessierung und Visualisierung der Spektren erfolgte mit TopSpin.

9 Literaturverzeichnis

1. Mulder, G.J., *Ueber die Zusammensetzung einiger thierischen Substanzen*. Journal für Praktische Chemie, 1839. **16**(1): p. 129-152.
2. Müller, J.P., *Export gefalteter Proteine – Tat-abhängige Proteintranslokation in Bakterien*. Biospektrum, 2002. **4/02 8.Jahrgang**: p. 360-364.
3. Fekkes, P. and A.J. Driessen, *Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(1): p. 161-73.
4. Driessen, A.J.M. and N. Nouwen, *Protein Translocation Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**(1): p. 643-667.
5. Gerlach, R.G. and M. Hensel, *Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens*. Int J Med Microbiol, 2007. **297**(6): p. 401-415.
6. Gunkel, K., M. Veenhuis, and I.J. Klei, *Protein translocation machineries: How organelles bring in matrix proteins*. FEMS Yeast Res, 2005. **5**(11): p. 1037-1045.
7. Mould, R.M. and C. Robinson, *A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane*. J Biol Chem, 1991. **266**(19): p. 12189-12193.
8. Dilks, K., et al., *Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey*. J Bacteriol, 2003. **185**(4): p. 1478-83.
9. Yen, M.-R., et al., *Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system*. Arch Microbiol, 2002. **177**(6): p. 441-450.
10. Chaddock, A.M., et al., *A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase*. EMBO J, 1995. **14**(12): p. 2715-22.
11. Sargent, F., et al., *Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway*. EMBO J, 1998. **17**(13): p. 3640-50.
12. Berks, B.C., *A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?* Mol Microbiol, 1996. **22**(3): p. 393-404.
13. Bogsch, E.G., et al., *An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18003-6.
14. Berks, B.C., T. Palmer, and F. Sargent, *Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway*. Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(2): p. 174-81.

15. Stanley, N.R., et al., *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *J Bacteriol*, 2001. **183**(1): p. 139-144.
16. Ize, B., et al., *Role of the Escherichia coli Tat pathway in outer membrane integrity*. *Mol Microbiol*, 2003. **48**(5): p. 1183-1193.
17. Bernhardt, T.G. and P.A.J.d. Boer, *The Escherichia coli amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway*. *Mol Microbiol*, 2003. **48**(5): p. 1171-1182.
18. Ochsner, U.A., et al., *Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(12): p. 8312-7.
19. Ding, Z. and P.J. Christie, *Agrobacterium tumefaciens twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion*. *J Bacteriol*, 2003. **185**(3): p. 760-71.
20. Bachmann, J., et al., *The Rieske protein from Paracoccus denitrificans is inserted into the cytoplasmic membrane by the twin-arginine translocase*. *FEBS J*, 2006. **273**(21): p. 4817-30.
21. De Buck, E., et al., *The twin-arginine translocation pathway is necessary for correct membrane insertion of the Rieske Fe/S protein in Legionella pneumophila*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(2): p. 259-64.
22. Zhang, L., et al., *Pleiotropic effects of the twin-arginine translocation system on biofilm formation, colonization, and virulence in Vibrio cholerae*. *BMC Microbiol*, 2009. **9**: p. 114.
23. Dilks, K., M.I. Gimenez, and M. Pohlschröder, *Genetic and biochemical analysis of the twin-arginine translocation pathway in halophilic archaea*. *J Bacteriol*, 2005. **187**(23): p. 8104-13.
24. Hutcheon, G.W. and A. Bolhuis, *The archaeal twin-arginine translocation pathway*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(Pt 3): p. 686-9.
25. Bolhuis, A., *Protein transport in the halophilic archaeon Halobacterium sp. NRC-1: a major role for the twin-arginine translocation pathway?* *Microbiology*, 2002. **148**: p. 3335-46.
26. Rose, R.W., et al., *Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway*. *Mol Microbiol*, 2002. **45**(4): p. 943-50.

27. Summer, E.J., et al., *The thylakoid delta pH-dependent pathway machinery facilitates RR-independent N-tail protein integration*. J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23483-90.
28. Blobel, G. and B. Dobberstein, *Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma*. J Cell Biol, 1975. **67**(3): p. 835-851.
29. Ling Lin, F., et al., *Protein secretion pathways in Bacillus subtilis: Implication for optimization of heterologous protein secretion*. Biotechnol Adv, 2006. **25**(1): p. 1-12.
30. Izard, J.W. and D.A. Kendall, *Signal peptides: exquisitely designed transport promoters*. Mol Microbiol, 1994. **13**(5): p. 765-773.
31. von Heijne, G., *Signal sequences : The limits of variation*. J Mol Biol, 1985. **184**(1): p. 99-105.
32. von Heijne, G., *The signal peptide*. J Membr Biol, 1990. **115**(3): p. 195-201.
33. Bendtsen, J.D., et al., *Prediction of twin-arginine signal peptides*. BMC Bioinformatics, 2005. **6**: p. 167.
34. Taylor, P.D., et al., *TATPred: a Bayesian method for the identification of twin arginine translocation pathway signal sequences*. Bioinformatics, 2006. **1**(5): p. 184-7.
35. Vrije, G.J., et al., *Lipid involvement in protein translocation in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1990. **4**(1): p. 143-150.
36. Cristobal, S., et al., *Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in Escherichia coli*. EMBO J, 1999. **18**(11): p. 2982-90.
37. von Heijne, G., *How signal sequences maintain cleavage specificity*. J Mol Biol, 1984. **173**(2): p. 243-251.
38. Tjalsma, H., et al., *Signal peptide-dependent protein transport in Bacillus subtilis: a genome-based survey of the secretome*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(3): p. 515-47.
39. Bogsch, E., S. Brink, and C. Robinson, *Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein*. EMBO J, 1997. **16**(13): p. 3851-9.
40. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-2948.
41. Waterhouse, A.M., et al., *Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench*. Bioinformatics, 2009. **25**(9): p. 1189-1191.

42. Palmer, T. *Substrates of the Tat pathway in E. coli*. [cited 2010 07/28]; Available from: http://www.lifesci.dundee.ac.uk/groups/tracy_palmer/docs/signals.htm.
43. Widdick, D.A., et al., *A facile reporter system for the experimental identification of twin-arginine translocation (Tat) signal peptides from all kingdoms of life*. *J Mol Biol*, 2008. **375**(3): p. 595-603.
44. Jongbloed, J.D., et al., *Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(46): p. 44068-78.
45. Stanley, N.R., T. Palmer, and B.C. Berks, *The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(16): p. 11591-6.
46. Buchanan, G., et al., *A genetic screen for suppressors of Escherichia coli Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif*. *Arch Microbiol*, 2001. **177**(1): p. 107-112.
47. Ize, B., et al., *In vivo dissection of the Tat translocation pathway in Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 2002. **317**(3): p. 327-335.
48. Ize, B., F. Gerard, and L.F. Wu, *In vivo assessment of the Tat signal peptide specificity in Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 2002. **178**(6): p. 548-553.
49. Walker, M.B., et al., *The Maize tha4 Gene Functions in Sec-Independent Protein Transport in Chloroplasts and Is Related to hcf106, tatA, and tatB*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(2): p. 267-276.
50. Mori, H., et al., *Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways*. *J Cell Biol*, 1999. **146**(1): p. 45-55.
51. Settles, A.M., et al., *Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein*. *Science*, 1997. **278**(5342): p. 1467-70.
52. Mori, H., E.J. Summer, and K. Cline, *Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid Delta pH-dependent protein transport*. *FEBS Lett*, 2001. **501**(1): p. 65-68.
53. Motohashi, R., et al., *An essential role of a TatC homologue of a Delta pH-dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10499-504.
54. Weiner, J.H., et al., *A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins*. *Cell*, 1998. **93**(1): p. 93-101.
55. Palmer, T. and B.C. Berks, *Moving folded proteins across the bacterial cell membrane*. *Microbiology*, 2003. **149**(3): p. 547-556.

-
56. Sargent, F., et al., *Sec-independent protein translocation in Escherichia coli. A distinct and pivotal role for the TatB protein.* J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36073-82.
 57. Yahr, T.L. and W.T. Wickner, *Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro.* EMBO J, 2001. **20**(10): p. 2472-9.
 58. Alami, M., et al., *Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in Escherichia coli.* J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20499-503.
 59. Chanal, A., C. Santini, and L. Wu, *Potential receptor function of three homologous components, TataA, TatB and TatE, of the twin-arginine signal sequence-dependent metalloenzyme translocation pathway in Escherichia coli.* Mol Microbiol, 1998. **30**(3): p. 674-6.
 60. Wexler, M., et al., *TatD Is a Cytoplasmic Protein with DNase Activity.* J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16717-16722.
 61. Berks, B.C., F. Sargent, and T. Palmer, *The Tat protein export pathway.* Mol Microbiol, 2000. **35**(2): p. 260-74.
 62. Porcelli, I., et al., *Characterization and Membrane Assembly of the TataA Component of the Escherichia coli Twin-Arginine Protein Transport System.* Biochemistry, 2002. **41**(46): p. 13690-13697.
 63. Chan, C.S., et al., *The TataA subunit of Escherichia coli twin-arginine translocase has an N-in topology.* Biochemistry, 2007. **46**(25): p. 7396-404.
 64. Nolandt, O.V., et al., *Structure analysis of the membrane protein TatC(d) from the Tat system of B. subtilis by circular dichroism.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(10): p. 2238-2244.
 65. Gouffi, K., C.-L. Santini, and L.-F. Wu, *Topology determination and functional analysis of the Escherichia coli TatC protein.* FEBS Lett, 2002. **525**(1-3): p. 65-70.
 66. Punginelli, C., et al., *Cysteine scanning mutagenesis and topological mapping of the Escherichia coli twin-arginine translocase TatC Component.* J Bacteriol, 2007. **189**(15): p. 5482-94.
 67. Jack, R.L., et al., *Constitutive expression of Escherichia coli tat genes indicates an important role for the Twin-Arginine Translocase during aerobic and anaerobic growth.* J. Bacteriol., 2001. **183**(5): p. 1801-1804.
 68. De Leeuw, E., et al., *Membrane interactions and self-association of the TataA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway.* FEBS Lett, 2001. **506**(2): p. 143-8.
-

69. Oates, J., et al., *The Escherichia coli twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular Tata complexes and minor TatAB complex*. J Mol Biol, 2005. **346**(1): p. 295-305.
70. Dabney-Smith, C. and K. Cline, *Clustering of C-terminal stromal domains of Tha4 homo-oligomers during translocation by the Tat protein transport system*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 2060-9.
71. Leake, M.C., et al., *Variable stoichiometry of the Tata component of the twin-arginine protein transport system observed by in vivo single-molecule imaging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(40): p. 15376-81.
72. Sargent, F., et al., *Purified components of the Escherichia coli Tat protein transport system form a double-layered ring structure*. Eur J Biochem, 2001. **268**(12): p. 3361-7.
73. Berthelmann, F., et al., *Recombinant expression of tatABC and tataAC results in the formation of interacting cytoplasmic Tata tubes in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2008. **283**(37): p. 25281-9.
74. Gohlke, U., et al., *The Tata component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(30): p. 10482-10486.
75. Westermann, M., et al., *The TatAd component of the Bacillus subtilis twin-arginine protein transport system forms homo-multimeric complexes in its cytosolic and membrane embedded localisation*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(4): p. 443-51.
76. Alami, M., et al., *Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in Escherichia coli*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 937-46.
77. Bolhuis, A., et al., *TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from Escherichia coli*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20213-9.
78. Orriss, G.L., et al., *TatBC, TatB, and TatC form structurally autonomous units within the twin arginine protein transport system of Escherichia coli*. FEBS Lett, 2007. **581**(21): p. 4091-7.
79. Allen, S.C., et al., *Essential cytoplasmic domains in the Escherichia coli TatC protein*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10362-6.
80. Buchanan, G., et al., *Functional complexity of the twin-arginine translocase TatC component revealed by site-directed mutagenesis*. Mol Microbiol, 2002. **43**(6): p. 1457-1470.

81. Cline, K. and H. Mori, *Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport*. J Cell Biol, 2001. **154**(4): p. 719-29.
82. de Leeuw, E., et al., *Oligomeric properties and signal peptide binding by Escherichia coli Tat protein transport complexes*. J Mol Biol, 2002. **322**(5): p. 1135-46.
83. Tarry, M.J., et al., *Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13284-9.
84. Theg, S.M., et al., *The energetics of the chloroplast Tat protein transport pathway revisited*. Trends Plant Sci, 2005. **10**(4): p. 153-154.
85. Cline, K., W.F. Ettinger, and S.M. Theg, *Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP*. J Biol Chem, 1992. **267**(4): p. 2688-96.
86. Mori, H. and K. Cline, *A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase*. J Cell Biol, 2002. **157**(2): p. 205-10.
87. Alder, N.N. and S.M. Theg, *Energetics of protein transport across biological membranes: A study of the thylakoid Delta pH-dependent/cpTat pathway*. Cell, 2003. **112**(2): p. 231-242.
88. Musser, S.M. and S.M. Theg, *Proton transfer limits protein translocation rate by the thylakoid DeltapH/Tat machinery*. Biochemistry, 2000. **39**(28): p. 8228-33.
89. Bageshwar, U.K. and S.M. Musser, *Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the Escherichia coli Tat machinery*. J Cell Biol, 2007. **179**(1): p. 87-99.
90. Braun, N.A., A.W. Davis, and S.M. Theg, *The chloroplast tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source*. Biophys J, 2007. **93**(6): p. 1993-1998.
91. Finazzi, G., et al., *Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no Delta pH dependence in vivo*. EMBO J, 2003. **22**(4): p. 807-815.
92. Di Cola, A., S. Bailey, and C. Robinson, *The thylakoid delta pH/delta psi are not required for the initial stages of Tat-dependent protein transport in tobacco protoplasts*. J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41165-70.
93. Palmer, T., F. Sargent, and B.C. Berks, *Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway*. Trends Microbiol, 2005. **13**(4): p. 175-180.

-
94. Gouffi, K., et al., *Dual topology of the Escherichia coli TatA Protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11608-11615.
 95. Dabney-Smith, C., H. Mori, and K. Cline, *Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5476-83.
 96. DeLisa, M.P., D. Tullman, and G. Georgiou, *Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6115-20.
 97. Musser, S.M. and S.M. Theg, *Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid DeltapH/Tat machinery*. Eur J Biochem, 2000. **267**(9): p. 2588-98.
 98. Matos, C.F., C. Robinson, and A. Di Cola, *The Tat system proofreads FeS protein substrates and directly initiates the disposal of rejected molecules*. EMBO J, 2008. **27**(15): p. 2055-63.
 99. Rodrigue, A., et al., *Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13223-8.
 100. Sanders, C., N. Wethkamp, and H. Lill, *Transport of cytochrome c derivatives by the bacterial Tat protein translocation system*. Mol Microbiol, 2001. **41**(1): p. 241-6.
 101. Turner, R.J., A.L. Papish, and F. Sargent, *Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs)*. Can J Microbiol, 2004. **50**(4): p. 225-38.
 102. Dubini, A. and F. Sargent, *Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins*. FEBS Lett, 2003. **549**(1-3): p. 141-6.
 103. Jack, R.L., et al., *Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 3962-72.
 104. Sargent, F., B. Berks, and T. Palmer, *Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein-transport system*. Arch Microbiol, 2002. **178**(2): p. 77-84.
 105. Oresnik, I.J., C.L. Ladner, and R.J. Turner, *Identification of a twin-arginine leader-binding protein*. Mol Microbiol, 2001. **40**(2): p. 323-331.
 106. Papish, A.L., C.L. Ladner, and R.J. Turner, *The twin-arginine leader-binding protein, DmsD, interacts with the TatB and TatC subunits of the Escherichia coli twin-arginine translocase*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32501-6.

-
107. Jongbloed, J.D.H., et al., *Two minimal Tat translocases in Bacillus*. Mol Microbiol, 2004. **54**(5): p. 1319-1325.
 108. Pop, O., et al., *The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatAd/Cd proteins of Bacillus subtilis form an autonomous Tat translocation system*. J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3268-73.
 109. Wu, L.F., et al., *Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2000. **2**(2): p. 179-89.
 110. Jongbloed, J.D.H., R. van der Ploeg, and J.M. van Dijl, *Bifunctional TatA subunits in minimal Tat protein translocases*. Trends Microbiol, 2006. **14**(1): p. 2-4.
 111. Blaudeck, N., et al., *Isolation and characterization of bifunctional Escherichia coli TatA mutant proteins that allow efficient Tat-dependent protein translocation in the absence of TatB*. J Biol Chem, 2005. **280**(5): p. 3426-3432.
 112. Barnett, J.P., et al., *A Minimal Tat System from a Gram-positive Organism*. J Biol Chem, 2008. **283**(5): p. 2534-2542.
 113. Jongbloed, J.D., et al., *TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41350-7.
 114. Müller, J.P., *Proteinsekretion in Bacillus subtilis*. Bioforum, 2003. **4**: p. 197-199.
 115. Eijlander, R.T., J.D. Jongbloed, and O.P. Kuipers, *Relaxed specificity of the Bacillus subtilis TatAdCd translocase in Tat-dependent protein secretion*. J Bacteriol, 2009. **191**(1): p. 196-202.
 116. Barnett, J.P., et al., *The twin-arginine translocation (Tat) systems from Bacillus subtilis display a conserved mode of complex organization and similar substrate recognition requirements*. FEBS J, 2009. **276**(1): p. 232-43.
 117. Kouwen, T.R., et al., *Overflow of a hyper-produced secretory protein from the Bacillus Sec pathway into the Tat pathway for protein secretion as revealed by proteogenomics*. Proteomics, 2009. **9**(4): p. 1018-32.
 118. Pop, O.I., et al., *Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in Bacillus subtilis*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38428-36.
 119. Schreiber, S., et al., *Affinity of TatCd for TatAd elucidates its receptor function in the Bacillus subtilis twin arginine translocation (Tat) translocase system*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 19977-84.

-
120. Voulhoux, R., et al., *Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway*. EMBO J, 2001. **20**(23): p. 6735-41.
 121. Saint-Joanis, B., et al., *Inactivation of Rv2525c, a substrate of the twin arginine translocation (Tat) system of Mycobacterium tuberculosis, increases beta-lactam susceptibility and virulence*. J Bacteriol, 2006. **188**(18): p. 6669-79.
 122. Marrichi, M., et al., *Genetic toggling of alkaline phosphatase folding reveals signal peptides for all major modes of transport across the inner membrane of bacteria*. J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 35223-35.
 123. McDonough, J.A., et al., *Identification of functional Tat signal sequences in Mycobacterium tuberculosis proteins*. J Bacteriol, 2008. **190**(19): p. 6428-38.
 124. Lavander, M., et al., *The twin arginine translocation system is essential for virulence of Yersinia pseudotuberculosis*. Infect Immun, 2006. **74**(3): p. 1768-76.
 125. De Buck, E., et al., *A putative twin-arginine translocation pathway in Legionella pneumophila*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(2): p. 654-61.
 126. De Buck, E., et al., *Differential 2-D protein gel electrophoresis analysis of Legionella pneumophila wild type and Tat secretion mutants*. Int J Med Microbiol, 2008. **298**(5-6): p. 449-61.
 127. De Buck, E., E. Lammertyn, and J. Anne, *The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence*. Trends Microbiol, 2008. **16**(9): p. 442-53.
 128. Pradel, N., et al., *Contribution of the twin arginine translocation system to the virulence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. Infect Immun, 2003. **71**(9): p. 4908-16.
 129. Lavander, M., et al., *Twin arginine translocation in Yersinia*. Adv Exp Med Biol, 2007. **603**: p. 258-67.
 130. Bronstein, P.A., et al., *Identification of a twin-arginine translocation system in Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 and its contribution to pathogenicity and fitness*. J Bacteriol, 2005. **187**(24): p. 8450-61.
 131. Gonzalez, E.T., et al., *Using the Ralstonia solanacearum Tat secretome to identify bacterial wilt virulence factors*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(12): p. 3779-86.
 132. Feilmeier, B.J., et al., *Green Fluorescent Protein Functions as a Reporter for Protein Localization in Escherichia coli*. J. Bacteriol., 2000. **182**(14): p. 4068-4076.
 133. Lee, P.A., D. Tullman-Ercek, and G. Georgiou, *The bacterial twin-arginine translocation pathway*. Annu Rev Microbiol, 2006. **60**: p. 373-95.

-
134. Santini, C.L., et al., *Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of Escherichia coli and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8159-64.
135. Thomas, J.D., et al., *Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2001. **39**(1): p. 47-53.
136. Ize, B., et al., *Novel Phenotypes of Escherichia coli tat Mutants Revealed by Global Gene Expression and Phenotypic Analysis*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47543-47554.
137. Barrett, C.M., et al., *Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin-arginine translocation pathway in Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(2): p. 279-84.
138. Gauthier, C., H. Li, and R. Morosoli, *Increase in xylanase production by Streptomyces lividans through simultaneous use of the Sec- and Tat-dependent protein export systems*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(6): p. 3085-92.
139. Kang, D.G., G.B. Lim, and H.J. Cha, *Functional periplasmic secretion of organophosphorous hydrolase using the twin-arginine translocation pathway in Escherichia coli*. J Biotechnol, 2005. **118**(4): p. 379-85.
140. Schaerlaekens, K., et al., *Comparison of the Sec and Tat secretion pathways for heterologous protein production by Streptomyces lividans*. J Biotechnol, 2004. **112**(3): p. 279-88.
141. Kolkman, M.A., et al., *The twin-arginine signal peptide of Bacillus subtilis YwbN can direct either Tat- or Sec-dependent secretion of different cargo proteins: secretion of active subtilisin via the B. subtilis Tat pathway*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(24): p. 7507-13.
142. Gerlach, R., O. Pop, and J.P. Müller, *Tat dependent export of E. coli phytase AppA by using the PhoD-specific transport system of Bacillus subtilis*. J Basic Microbiol, 2004. **44**(5): p. 351-359.
143. Tan, S., H.T. Tan, and M.C.M. Chung, *Membrane proteins and membrane proteomics*. Proteomics, 2008. **8**(19): p. 3924-3932.
144. Lindenstrauss, U. and T. Brüser, *Tat transport of linker-containing proteins in Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **295**(1): p. 135-40.
145. Holzapfel, E., et al., *Twin-arginine-dependent translocation of SufI in the absence of cytosolic helper proteins*. Biochemistry, 2009. **48**(23): p. 5096-105.
-

-
146. Guymer, D., J. Maillard, and F. Sargent, *A genetic analysis of in vivo selenate reduction by Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2 and Escherichia coli K12*. Arch Microbiol, 2009. **191**(6): p. 519-28.
147. Bürck, J., *Circular dichroismus*. Vorlesung, 2005.
148. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*. Biochim Biophys Acta - Proteins & Proteomics, 2005. **1751**(2): p. 119-139.
149. Bulheller, B.M., A. Rodger, and J.D. Hirst, *Circular and linear dichroism of proteins*. Phys Chem Chem Phys, 2007. **9**(17): p. 2020-2035.
150. Lobley, A., L. Whitmore, and B.A. Wallace, *DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra*. Bioinformatics, 2002. **18**(1): p. 211-212.
151. Moffitt, W., *Optical Rotatory Dispersion of Helical Polymers*. J Chem Phys, 1956. **25**(3): p. 467-478.
152. Wu, Y., H.W. Huang, and G.A. Olah, *Method of oriented circular dichroism*. Biophys J, 1990. **57**(4): p. 797-806.
153. Bürck, J., et al., *Conformation and Membrane Orientation of Amphiphilic Helical Peptides by Oriented Circular Dichroism*. Biophys J, 2008. **95**(8): p. 3872-3881.
154. Chen, F.-Y., M.-T. Lee, and H.W. Huang, *Sigmoidal Concentration Dependence of Antimicrobial Peptide Activities: A Case Study on Alamethicin*. Biophys J, 2002. **82**(2): p. 908-914.
155. Gerlach, W. and O. Stern, *Der experimentelle Nachweis der Richtungsquantelung im Magnetfeld*. Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, 1922. **9**(1): p. 349-352.
156. Müller, S.D., *Strukturuntersuchungen am bakteriellen Tat-Proteinexportsystem*. 2007, Dissertation Universität Karlsruhe.
157. Hartmann, S.R. and E.L. Hahn, *Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame*. Phys Rev, 1962. **128**(5): p. 2042.
158. Wu, C.H., A. Ramamoorthy, and S.J. Opella, *High-Resolution Heteronuclear Dipolar Solid-State NMR Spectroscopy*. J Magn Reson Ser A, 1994. **109**(2): p. 270-272.
159. Lee, M. and W.I. Goldberg, *Nuclear-Magnetic-Resonance Line Narrowing by a Rotating rf Field*. Phys Rev, 1965. **140**(4A): p. A1261.
160. Nevzorov, A.A. and S.J. Opella, *Selective averaging for high-resolution solid-state NMR spectroscopy of aligned samples*. J Magn Reson, 2007. **185**(1): p. 59-70.
-

-
161. Nevzorov, A.A. and S.J. Opella, *A "magic sandwich" pulse sequence with reduced offset dependence for high-resolution separated local field spectroscopy*. J Magn Reson, 2003. **164**(1): p. 182-6.
162. Takegoshi, K. and C.A. McDowell, *A "magic echo" pulse sequence for the high-resolution NMR spectra of abundant spins in solids*. Chem Phys Lett, 1985. **116**(2-3): p. 100-104.
163. Lange, C., et al., *Structure analysis of the protein translocating channel TatA in membranes using a multi-construct approach*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(10): p. 2627-34.
164. Lee, P.A., et al., *Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation*. J Bacteriol, 2002. **184**(21): p. 5871-9.
165. Walther, T.H., *Herstellung von TatA-Fragmenten für NMR-spektroskopische Untersuchungen*. 2006, Diplomarbeit Universität Karlsruhe.
166. Miroux, B. and J.E. Walker, *Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels*. J Mol Biol, 1996. **260**(3): p. 289-98.
167. Wilkins, M.R., et al., *Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS--a World-Wide-Web-accessible tool*. Electrophoresis, 1997. **18**(3-4): p. 403-8.
168. Gasteiger, E., et al., *ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3784-8.
169. Mikhaleva, N.I., et al., *Requirement for phospholipids of the translocation of the trimethylamine N-oxide reductase through the Tat pathway in Escherichia coli*. FEBS Lett, 1999. **463**(3): p. 331-335.
170. Marassi, F.M. and S.J. Opella, *NMR structural studies of membrane proteins*. Curr Opin Struct Biol, 1998. **8**(5): p. 640-648.
171. McDermott, A., *Structure and Dynamics of Membrane Proteins by Magic Angle Spinning Solid-State NMR*. Annu Rev Biophys, 2009. **38**(1): p. 385-403.
172. Tycko, R., *Biomolecular solid state NMR: Advances in Structural Methodology and Applications to Peptide and Protein Fibrils1*. Annu Rev Phys Chem, 2001. **52**(1): p. 575-606.
173. Prosser, R.S., S.A. Hunt, and R.R. Vold, *Improving Sensitivity in Mechanically Oriented Phospholipid Bilayers Using Ultrathin Glass Plates - A Deuterium Solid-State NMR Study*. J Magn Reson B, 1995. **109**(1): p. 109-111.
-

-
174. Howard, K.P. and S.J. Opella, *High-resolution solid-state NMR spectra of integral membrane proteins reconstituted into magnetically oriented phospholipid bilayers*. J Magn Reson B, 1996. **112**(1): p. 91-4.
175. Katsaras, J., et al., *Rarely Observed Phase Transitions in a Novel Lyotropic Liquid Crystal System*. Phys Rev Lett, 1997. **78**(5): p. 899.
176. Raffard, G., et al., *Temperature-Composition Diagram of Dimyristoylphosphatidylcholine-Dicaproylphosphatidylcholine "Bicelles" Self-Orienting in the Magnetic Field. A Solid State ^2H and ^{31}P NMR Study*. Langmuir, 2000. **16**(20): p. 7655-7662.
177. Ottiger, M. and A. Bax, *Characterization of magnetically oriented phospholipid micelles for measurement of dipolar couplings in macromolecules*. J Biomol NMR, 1998. **12**(3): p. 361-372.
178. Marcotte, I. and M. Auger, *Bicelles as model membranes for solid- and solution-state NMR studies of membrane peptides and proteins*. Concepts Magn Reson Part A, 2005. **24A**(1): p. 17-37.
179. Sanders, C.R. and J.P. Schwonek, *Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR*. Biochemistry, 1992. **31**(37): p. 8898-8905.
180. Struppe, J., J.A. Whiles, and R.R. Vold, *Acidic phospholipid bicelles: a versatile model membrane system*. Biophys J, 2000. **78**(1): p. 281-9.
181. Tiburu, E.K., D.M. Moton, and G.A. Lorigan, *Development of magnetically aligned phospholipid bilayers in mixtures of palmitoylstearylphosphatidylcholine and dihexanoylphosphatidylcholine by solid-state NMR spectroscopy*. Biochim Biophys Acta - Biomembranes, 2001. **1512**(2): p. 206-214.
182. Whiles, J.A., et al., *Methods for studying transmembrane peptides in bicelles: consequences of hydrophobic mismatch and peptide sequence*. J Magn Reson. **158**(1-2): p. 149-156.
183. Ottiger, M. and A. Bax, *Bicelle-based liquid crystals for NMR-measurement of dipolar couplings at acidic and basic pH values*. J Biomol NMR, 1999. **13**(2): p. 187-191.
184. Picard, F., et al., *^{31}P NMR First Spectral Moment Study of the Partial Magnetic Orientation of Phospholipid Membranes*. Biophys J, 1999. **77**(2): p. 888-902.
-

-
185. Prosser, R.S., et al., *Magnetically Aligned Membrane Model Systems with Positive Order Parameter: Switching the Sign of S_{zz} with Paramagnetic Ions*. J Am Chem Soc, 1996. **118**(1): p. 269-270.
186. Dabney-Smith, C., H. Mori, and K. Cline, *Requirement of a *Tha4*-conserved transmembrane glutamate in thylakoid *Tat* translocase assembly revealed by biochemical complementation*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43027-43033.
187. Park, S.H., et al., *Rotational diffusion of membrane proteins in aligned phospholipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy*. J Magn Reson, 2006. **178**(1): p. 162-5.
188. De Angelis, A.A., S.C. Howell, and S.J. Opella, *Assigning solid-state NMR spectra of aligned proteins using isotropic chemical shifts*. J Magn Reson, 2006. **183**(2): p. 329-32.
189. *Statistics Calculated for Selected Chemical Shifts from Atoms in the 20 Common Amino Acids, Biological Magnetic Resonance Data Bank*; http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm#2; 01.02.2010.
190. Ulrich, E.L.e.a., *BioMagResBank*. Nucl. Acids Res., 2008. **36**: p. D402-408.
191. Marassi, F.M., A. Ramamoorthy, and S.J. Opella, *Complete resolution of the solid-state NMR spectrum of a uniformly ^{15}N -labeled membrane protein in phospholipid bilayers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8551-6.
192. Nevzorov, A.A., M.F. Mesleh, and S.J. Opella, *Structure determination of aligned samples of membrane proteins by NMR spectroscopy*. Magn Reson Chem, 2004. **42**(2): p. 162-171.
193. Hester, R.K., et al., *Separated Local Field Spectra in NMR: Determination of Structure of Solids*. Phys Rev Lett, 1976. **36**(18): p. 1081.
194. Schiffer, M. and A.B. Edmundson, *Use of Helical Wheels to Represent the Structures of Proteins and to Identify Segments with Helical Potential*. Biophys J, 1967. **7**(2): p. 121-135.
195. Wu, C.H., et al., *Simultaneous Characterization of the Amide ^1H Chemical Shift, ^1H - ^{15}N Dipolar, and ^{15}N Chemical Shift Interaction Tensors in a Peptide Bond by Three-Dimensional Solid-State NMR Spectroscopy*. J Am Chem Soc, 1995. **117**(22): p. 6148-6149.
196. Brender, J.R., D.M. Taylor, and A. Ramamoorthy, *Orientation of Amide-Nitrogen-15 Chemical Shift Tensors in Peptides: A Quantum Chemical Study*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(5): p. 914-922.

-
197. Wang, J., et al., *Imaging Membrane Protein Helical Wheels*. J Magn Reson, 2000. **144**(1): p. 162-167.
198. De Angelis, A.A., et al., *Structure Determination of a Membrane Protein with Two Trans-membrane Helices in Aligned Phospholipid Bicelles by Solid-State NMR Spectroscopy*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(37): p. 12256-12267.
199. Müller, S.D., et al., *Structural characterization of the pore forming protein TatAd of the twin-arginine translocase in membranes by solid-state ^{15}N -NMR*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(12): p. 3071-9.
200. DeLano, W.L., *The PyMOL Molecular Graphics System*. 2002, DeLano Scientific: San Carlos, CA, USA.
201. Klassen, R.B. and S.J. Opella, *NMR studies of peptides and proteins associated with membranes*. Methods Mol Biol, 1997. **60**: p. 271-97.
202. Vold, R.R., R.S. Prosser, and A.J. Deese, *Isotropic solutions of phospholipid bicelles: A new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides*. J Biomol NMR, 1997. **9**(3): p. 329-335.
203. Bogusky, M.J., P. Tsang, and S.J. Opella, *One- and two- dimensional $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR of filamentous phage coat proteins in solution*. Biochem Biophys Res Commun, 1985. **127**(2): p. 540-545.
204. Strandberg, E., et al., *Orientation and Dynamics of Peptides in Membranes Calculated from ^2H -NMR Data*. Biophys J, 2009. **96**(8): p. 3223 - 3232.
205. Hu, Y., et al., *Solution NMR structure of the TatA component of the twin-arginine protein transport system from Gram-positive bacterium Bacillus subtilis*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(45): p. 15942-15944.
206. Walther, T.H., et al., *Membrane alignment of the pore-forming component TatA_d of the twin-arginine translocase from Bacillus subtilis resolved by solid-state NMR spectroscopy*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(45): p. 15945-15956.
207. Grage, S.L., et al., *The charge ZIPper is a novel assembly motif in membrane proteins, realized in the TatA translocation pore*. **In preparation**.
208. Russ, W.P. and D.M. Engelman, *The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association*. J Mol Biol, 2000. **296**(3): p. 911-919.
209. Go, N. and H.A. Scheraga, *On the Use of Classical Statistical Mechanics in the Treatment of Polymer Chain Conformation*. Macromolecules, 1976. **9**(4): p. 535-542.
210. Warren, G., et al., *Contributions of the transmembrane domain and a key acidic motif to assembly and function of the TatA complex*. J Mol Biol, 2009. **388**(1): p. 122-32.
-

211. Goddard, T.D. and D.G. Kneller, *SPARKY 3*, University of California, San Francisco.
212. Delaglio, F., et al., *NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes*. J Biomol NMR, 1995. **6**(3): p. 277-293.
213. Cai, M., et al., *An efficient and cost-effective isotope labeling protocol for proteins expressed in shape Escherichia coli*. J Biomol NMR, 1998. **11**(1): p. 97-102.
214. Levitt, M.H., D. Suter, and R.R. Ernst, *Spin dynamics and thermodynamics in solid-state NMR cross polarization*. J Chem Phys, 1986. **84**(8): p. 4243-4255.
215. Sinha, N., et al., *SPINAL modulated decoupling in high field double- and triple-resonance solid-state NMR experiments on stationary samples*. J Magn Reson, 2005. **177**(2): p. 197-202.
216. Fung, B.M., A.K. Khitrin, and K. Ermolaev, *An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids*. J Magn Reson, 2000. **142**(1): p. 97-101.

10 Publikationsliste

10.1 Beiträge in referenzierten Zeitschriften

- (1) *“Structure analysis of the protein translocating channel TatA in membranes using a multi-construct approach”*

Lange C., Müller S. D., Walther T. H., Bürck J., and Ulrich A. S.,
Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(10): p. 2627-2634.

- (2) *“Structural characterization of the pore forming protein TatA_d of the twin-arginine translocase in membranes by solid-state ¹⁵N-NMR”*

Müller S. D., De Angelis A. A., Walther T. H., Grage S. L., Lange C., Opella S. J. and Ulrich A. S.,
Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(12): p. 3071-3079

- (3) *“Structure analysis of the membrane protein TatC(d) from the Tat system of B. subtilis by circular dichroism”*

Nolandt O. V., Walther T. H., Roth S., Bürck J. and Ulrich A. S.,
Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(10): p. 2238-2244

- (4) *“Membrane alignment of the pore-forming component TatA_d of the twin-arginine translocase from B. subtilis resolved by solid-state NMR spectroscopy”*

Walther T. H., Grage S. L., Roth N. and Ulrich A. S.,
J Am Chem Soc, 2010. **132**(45): p. 15945-15956

- (5) *“Magnetically oriented dodecylphosphocholine bicelles for solid-state NMR structure analysis”*

Nolandt O. V., Walther T. H., Grage S. L. and Ulrich A. S.;
Biochim Biophys Acta, in revision

- (6) *“The charge ZIPper is a novel assembly motif in membrane proteins, realized in the TatA translocation pore”*

Grage S. L., Walther T. H., Wolf, M., Vargiu A., Klein M. J., Ruggerone P., Wenzel W. and Ulrich A. S.,
In preparation

10.2 Tagungsbeiträge

- (1) „*Structural characterization of the Tat-translocase pore-forming protein $TatA_d$ from *B. subtilis**”

Walther T. H., Müller S. D., Lange C., Bürck J., Grage S. L., Nolandt O. and Ulrich A. S.

CFN Summer School on Nano-Biology, Bad Herrenalb, 2007

- (2) „*Structural characterization of the Tat-translocase pore-forming protein $TatA_d$ from *B. subtilis**”

Walther T. H., Grage S. L., Muhle-Goll C., Bürck, J., Müller S. D., Lange C., Nolandt O., Klein M. J., Angelis A. A., Opella S. J. and Ulrich A. S.

International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), San Diego, USA, 2008

- (3) „*Pore formation and structure of the twin arginine translocase subunit $TatA$ from *B. subtilis**”

Grage S. L., Walther T. H., Muhle-Goll C., Nolandt O., Klein M. J., Roth N., Müller S. D., Callow P., Angelis A. A., Filipp F. V., Opella S. J. and Ulrich A. S.

Biophysical Society Meeting, Boston, USA, 2009

- (4) „*Interactions of the Tat-dependent signal peptide of *B. subtilis* with the Tat-translocase*”

Klein M. J., Bürck, J., Muhle-Goll C., Callow P., Walther T. H., Nolandt O., Afonin S., Grage, S. L. and Ulrich A. S.

CFN Summer School on Nano-Biology, Bad Herrenalb, 2009

- (5) „*Structure of the pore-forming subunit of the twin arginine translocase determined using a combined approach of liquid- and solid-state NMR*”

Walther T. H., Grage S. L., Muhle-Goll C., Jakovkin I., Sternberg U., Filipp F. V., Afonin S., Roth N., Müller S. D., Opella S. J. and Ulrich A. S.

Biophysics of Membrane-active peptides, Bad Honnef, 2010

- (6) „*Structure of the pore-forming subunit of the twin arginine translocase determined by combining liquid- and solid-state NMR*”

Muhle-Goll C., Walther T. H., Grage S. L., Jakovkin I., Sternberg U., Filipp F. V., Afonin S., Müller S. D., Opella S. J. and Ulrich A. S.

EUROMAR, Florence, Italien, 2010

- (7) „*Structure analysis of the prePhoD signal peptide: functional implications of an amphiphilic helix for approaching the Tat translocase*”

Klein M. J., Bürck, J., Muhle-Goll C., Callow P., Walther T. H., Nolandt O., Afonin S., Grage, S. L and Ulrich A. S.

International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Cairns, Australien, 2010

- (8) „*Structure of the pore-forming subunit of the twin arginine translocase determined by combining liquid- and solid-state NMR*”

Grage S. L., Walther T. H., Muhle-Goll C., Jakovkin I., Sternberg S., Afonin S., Roth N., Müller S. D. and Ulrich A. S.

International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Cairns, Australien, 2010

11 Lebenslauf

| | |
|-----------------------------------|--|
| | Torsten Hartwig Walther |
| | Geburtsdatum: 30. November 1980 |
| | Geburtsort: Bad Bergzabern |
| | Schule |
| | Grundschule Bad Bergzabern |
| | Kooperative Gesamtschule Bad Bergzabern |
| | Gymnasium Bad Bergzabern |
| | Allgemeine Hochschulreife (Abitur) |
| | Zivildienst |
| | Zivildienst in der Edith-Stein-Fachklinik in Bad Bergzabern |
| | Studium |
| | Chemiestudium an der Universität Karlsruhe (TH) Abschluss im August 2006 zum Diplom – Chemiker |
| | Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie bei Prof Dr. Anne S. Ulrich: Herstellung von TatA-Fragmenten zur NMR- spektroskopischen Untersuchung |
| | Promotionsstudium am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie bei Prof. Dr. Anne S. Ulrich |
| | Dissertation: Strukturuntersuchungen am porenbildenden Translokationsprotein TatA _d aus <i>B. subtilis</i> |
| 1987 - 1991 | |
| 1991 - 1993 | |
| 1993 - 2000 | |
| Juni 2000 | |
| Oktober 2000 - August 2001 | |
| Oktober 2001 - August 2006 | |
| seit Oktober 2006 | |

Seit Oktober 2006

Beruflicher Werdegang

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie

Oktober 2007 - Dezember 2007

Lehrbeauftragter für
„Organische und Biochemische Analytik“
an der Berufsakademie Karlsruhe

Oktober 2008 - Dezember 2008

Lehrbeauftragter für
„Organische und Biochemische Analytik“
an der Berufsakademie Karlsruhe

Oktober 2009 - Dezember 2009

Lehrbeauftragter für
„Organische und Biochemische Analytik“
an der Dualen Hochschule Baden-
Württemberg (DHBW)

März 2007

Berufliche Fortbildung

Trainingskurs: ÄKTApurifier

August 2008

Teilnahme mit Posterbeitrag an der International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), San Diego, USA

August 2008 - November 2008

Auslandsaufenthalt

Forschungsaufenthalt zur Festkörper-NMR Spektroskopie bei Prof. Dr. S. J. Opella an der University of California, San Diego, La Jolla, USA

Juni 2000

Auszeichnungen und Stipendien

Buchpreis des Fonds der Chemischen Industrie als Bester Abiturient im Fach Chemie im Jahr 2000 am Gymnasium Bad Bergzabern

August 2008 - November 2008

Karlsruhe House of Young Scientists (KHYS)
Auslandsstipendium