

Membraninteraktionen der Tat - abhängigen Translokase von PhoD 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

genehmigte

DISSERTATION

von Diplom-Chemiker

Marco Jan Klein

aus Gernsbach

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Burkhard Luy

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2012

„Wer glaubt, etwas zu sein, hat aufgehört, etwas zu werden.“

Sokrates

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Februar 2009 bis Februar 2012 am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie, unter der Leitung von Prof. A. S. Ulrich angefertigt. Außerdem wurden Teile der Arbeit von August 2010 bis September 2010 an der University of Melbourne, Victoria (Australien) in der Gruppe von Prof. F. Separovic angefertigt.

Danksagung

Frau Prof. Anne S. Ulrich danke ich sehr für die freundliche und menschliche Atmosphäre in ihrem Arbeitskreis. Ich möchte mich aber auch dafür bedanken, dass ich sehr offen in diesen aufgenommen wurde, weil mir dies die geistige Freiheit gab mich weiterzuentwickeln. Natürlich möchte ich mich auch für alle zur Verfügung stehenden Ressourcen und wertvollen Diskussionen recht herzlich bedanken.

Herrn Dr. Stephan Grage, möchte ich für seine exzellente Betreuung, das Verständnis für private Angelegenheiten und seine grenzenlose Hilfsbereitschaft sehr, sehr danken. Einfach ein riesengroßes Dankeschön an Dich Stephan!

Frau Dr. Claudia Muhle-Goll danke ich für die große Hilfe bei der Messung und Auswertung der Flüssigkeits-NMR Spektren und für die konstruktiven Kritiken bezüglich mancher Schriftarbeit.

Frau Dr. Olga Nolandt danke ich für die gute Zusammenarbeit beim Tata- Projekt und die Einführung in die eine oder andere Laborpraxis während meiner Diplomarbeit.

Herrn Dr. Jochen Bürck und Herrn Siegmur Roth danke ich sehr für ihre Unterstützung bei der Durchführung der CD- und OCD-Messungen, für ihr hilfreiches Wissen rund um die Theorie und Praxis der CD-Spektroskopie und ihre stets sehr schnelle Hilfe.

Herrn Dr. Torsten Walther möchte ich für seine ständige Hilfsbereitschaft und beruhigende Art danken. Was wäre nur aus mir ohne Dich als Vorreiter geworden?!? :)

Frau Christina Gottselig möchte ich für die entspannte Zusammenarbeit bei ihrer exzellenten Diplomarbeit danken. Meine Lieblingsdiplomandin eben... :)

Herrn Dr. Sergii Afonin danke ich für die Durchführung der MALDI-TOF-Messungen und für seine stets scharfe, aber angebrachte Kritik in Präsentationen.

Herrn Christian Weber möchte ich danken, weil er immer ein hilfsbereiter und zuverlässiger Mitarbeiter war und ich ohne ihn die Rheinauen wohl nie von so einer schönen Seite gesehen hätte!

Frau Prof. Frances Separovic möchte ich für die offene Aufnahme in Ihren Arbeitskreis im Rahmen meines Auslandsaufenthaltes danken. Herrn Dr. John Gehman möchte ich für die sehr gute Betreuung während meines Auslandsaufenthaltes danken.

Allen anderen Mitarbeiter des Arbeitskreises danke ich für die offene Aufnahme, die tolle Arbeitsatmosphäre, die Hilfe bei kleinen und großen Dingen, die wertvollen wissenschaftlichen & philosophischen Diskussionen und so manches außeruniversitäres Erlebnis.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Geschwistern im Geiste und allen Menschen, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg auf die eine oder andere Art bereichert und erfüllt haben. Die vorliegende Arbeit ist ihnen gewidmet.

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 21. Februar 2012

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	<i>arbitrary units</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
CD	<i>Circular Dichroism</i> (Zirkulardichroismus)
Da	Dalton
dest.	destilliert
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	Desoxy Ribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Gramm
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin Gehalt
h	Stunden
HisTag	Hexahistidin-Anhang
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
Kan	Kanamycin
Kan50	Kanamycin in einer Konzentration von 50 µg/ml
LB	Luria Bertani
M	molar
mA	Milliamper

MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
N	Nukleotid
NLS	Natriumlauroylsarcosin
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</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
P/L	Protein-Lipid-Verhältnis
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
ppm	<i>parts per million</i> (Teile von einer Million)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rH	<i>relative humidity</i> (relative Luftfeuchte)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Sec	sekretorisch
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i> <i>Sonicated Unilamellar Vesicles</i>
Tat	Twin Arginine Translocation
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
T _m	Schmelzpunkt
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

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Membrantransport	2
1.2 Translokation von Proteinen	3
1.3 Tat-abhängiger Proteintransport	4
1.3.1 Komponenten des Tat-abhängigen Transports	6
1.3.2 Tat-abhängiger Transport in <i>B.subtilis</i>	8
1.3.3 Tat-abhängige Signalpeptide	10
2 Aufgabenstellung	17
3 Ergebnisse	18
3.1 Untersuchungen am Signalpeptid von PhoD	18
3.1.1 Expression, Aufreinigung und Charakterisierung des Signalpeptids von PhoD	18
3.1.2 Zirkulardichroismus (CD) Messungen am Signalpeptid von PhoD	20
3.1.3 Orientierte CD-Spektroskopie des Signalpeptids von PhoD in Lipiddoppelschichten	23
3.1.4 Vorhersage der Sekundärstruktur des SP mittels verschiedener Softwareprogramme	25
3.1.5 Berechnung des hydrophoben Moments des SP	26
3.1.6 Flüssigkeits-NMR Spektroskopie am Signalpeptid von PhoD	28
3.1.6.1 ¹ H, ¹⁵ N-HSQC-Spektroskopie	28
3.1.6.2 Sekundärstruktur des Signalpeptids aus ¹³ C-chemischen Verschiebungen	30
3.1.6.3 Strukturinformation aus ¹ H- ¹ H-Kontakten	32
3.2 Untersuchung des Einflusses von TatA_d auf die Lipiddoppelschicht	33
3.2.1 Die verschiedenen TatA _d -Fragmente	33
3.2.2 T ₁ - und T ₂ - ² H-NMR-Relaxationsmessungen an Lipidkopfguppen mit verschiedenen TatA _d - Fragmenten	34
3.2.2.1 Einfluss des Protein/Lipid-Verhältnisses auf T ₁ und T ₂	34
3.2.2.2 Einfluss der verschiedenen Fragmente auf T ₁ und T ₂	35
3.2.3 Untersuchung der Quadrupol-Aufspaltung der Lipidkopfguppen mit verschiedenen TatA _d - Fragmenten	36
3.2.3.1 Einfluss der Temperatur auf die Aufspaltungen	38
3.2.3.2 Einfluss des Protein/Lipid-Verhältnisses auf die Quadrupolauflösung	40
3.2.3.3 Untersuchung der Quadrupol-Aufspaltung der verschiedenen TatA _d -Fragmente	41
3.3 Neutronenstreuungsexperimente zur Untersuchung der Wechselwirkung der einzelnen Komponenten des Tat-Systems	45
4 Diskussion	51
4.1 Das Signalpeptid von PhoD aus <i>B.subtilis</i>	51
4.2 Wechselwirkung des TatA_d mit der Lipiddoppelschicht	54
4.3 Wechselwirkung der Komponenten des Tat-Systems von <i>B. subtilis</i> untereinander	58
5 Ausblick	60
6 Zusammenfassung	62
7 Material	64
7.1 Geräte	64
7.2 Verbrauchsmaterialien	66
7.3 Chemikalien	67
7.4 Protein Marker	69
7.5 Kits für die Molekularbiologie	70

7.6 Affinitätschromatographiesäulchen.....	70
7.7 Enzyme.....	70
7.8 Vektoren.....	70
7.9 Bakterienstämme.....	71
7.10 Expressionsstämme.....	71
7.11 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	71
7.11.1 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie	71
7.11.2 Puffer und Lösungen für die SDS-Page	73
7.11.3 Puffer für die HisTrap-Affinitätschromatographie	75
7.12 Software	76
8 Methoden.....	77
8.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden	77
8.1.1 Steriltechnik	77
8.1.2 Ansetzen einer Übernachtskultur	77
8.1.3 Ansetzen einer Glycerinkultur.....	77
8.1.4 Herstellung von Agarplatten	77
8.1.5 Ausstrich aus einer Glycerinkultur	78
8.2 Genetische Arbeitsmethoden	78
8.2.1 Plasmid-DNA Isolierung.....	78
8.2.2 DNA-Sequenzierung.....	79
8.2.3 Darstellung hitzekompetenter Zellen	79
8.2.4 Hitzetransformation.....	79
8.3 Proteinchemische Methoden	80
8.3.1 Expression	80
8.3.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall.....	81
8.3.3 Lokalisation des Proteins.....	81
8.3.4 Dialyse	81
8.3.5 Thrombinspaltung	82
8.4 Chromatographische Methoden	82
8.4.1 Nickel-Affinitätschromatographie	82
8.5 Analytik	83
8.5.1 UV-Quantifizierung	83
8.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	84
8.5.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	85
8.5.4 CD-Spektroskopie.....	86
8.5.5 Orientierte CD-Spektroskopie.....	87
8.5.6 Flüssigkeits-NMR Spektroskopie.....	87
8.5.7 Festkörper-NMR Spektroskopie	88
8.5.8 Neutronenbeugungsexperimente	89
9 Literaturverzeichnis.....	91
10 Anhang	95
11 Publikationsliste	96
11.1 Beiträge in referenzierten Zeitschriften	96
11.2 Tagungsbeiträge.....	96
12 Lebenslauf.....	98

1 Einleitung

Unter allen Biomolekülen des Lebens weisen Proteine die wohl größte Diversität und Funktionalität auf. Die Möglichkeit der Interaktion mit verschiedenen Partnern führt zu nahezu unbegrenzten Einsatzmöglichkeiten in allen lebenden Organismen dieses Planeten. Durch ihren Aufbau aus unterschiedlichen Aminosäureresten und der daraus resultierenden kombinatorischen Vielfalt besitzen Proteine die Eigenschaft ihre Oberfläche in sämtliche denkbare Formen zu verwandeln. Hinzu ermöglichen die chemischen Eigenschaften der verschiedenen Aminosäuren und deren Zusammenspiel Wechselwirkungen verschiedenster Art, wie z. B. ionische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte oder Wasserstoffbrücken. Proteine sind die Werkzeuge unseres Körpers und können aufgrund der oben genannten Vorteile ihrer Beschaffenheit andere Substanzen erkennen bzw. binden. Ein eindruckvolles Beispiel ist die menschliche Immunabwehr. Antikörper verstehen es nicht nur Moleküle der unbelebten Welt, sondern auch das ganze Spektrum biologischer Stoffe zu binden. Ihre funktionellen Möglichkeiten sind so weitreichend, dass sie in Prozessen wie Signaltransduktion, Katalyse, Speicherung und Transport von Molekülen zum Einsatz kommen. Ohne Proteine wäre das Leben in der Form, in der wir es heute kennen, nicht möglich. Die Wortgebung dieser Stoffklasse geschah daher nicht ohne Grund. Jöns Jakob Berzelius leitete 1838 das Wort Protein von dem griechischen Wort πρωτεω (proteuo, „ich nehme den ersten Platz ein“, von πρῶτος, protos, „erstes“, „wichtigstes“) ab.¹ Alleine die Körperflüssigkeiten des Menschen enthalten mehrere tausend unterschiedliche Proteine. Viele dieser Proteine naszieren jedoch intrazellulär. Dies führt zu der Konsequenz, dass Proteine Membranen passieren müssen, um an ihren Wirk- oder Abbauort zu gelangen.² Durch das Fehlen eines Zellkerns findet in Bakterienzellen die Proteinbiosynthese ausschließlich im Cytosol statt. In Eukaryonten werden Proteine aber auch in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle benötigt. Um solche natürlichen Translokationsbarrieren zu überwinden, haben manche Proteine sich auf den Transport von Arzneimitteln, Hormonen, Metallionen und eben sogar anderen Proteinen spezialisiert.

1.1 Membrantransport

Erst die Ausbildung von Kompartimenten innerhalb von Zellen durch biologische Membranen ermöglichte, dass Reaktionen unter verschiedenen Bedingungen stattfinden können. Um jedoch diese Reaktionsräume aufrecht und generell zelluläres Leben zu erhalten, ist ein ständiger Austausch verschiedenster Stoffe notwendig. So finden sich in jeder Zelle, egal ob in Einzellern oder höheren Organismen, unterschiedliche Systeme, die den Transport über hydrophobe Biomembranen bewerkstelligen. Bei den meisten Transportvorgängen spielt ein Konzentrationsgradient eine wichtige Rolle, der oft in Form eines Ionengradienten an diesen Translokationen beteiligt ist. Gase und kleine, lipophile Substanzen benötigen keine speziellen Transportmechanismen, da sie alleine durch einfache Diffusion entlang eines Gradienten die hydrophobe Barriere überwinden können. Auch kleine polare Moleküle wie Wasser oder Harnstoff können, wenn auch weitaus langsamer, ohne Hilfe eines membrandurchspannenden Proteinkomplexes durch die Lipiddoppelschicht diffundieren. Desweiteren können Transportvorgänge in „passiven“ und „aktiven“ Transport unterteilt werden. Unter passivem Transport werden Translokationsprozesse gezählt, die ohne externe Energiequelle auskommen. Hierzu zählen die „freie Diffusion“ mittels Kanalproteinen, die eine Art Tunnel bilden, der es z.B. Ionen ermöglicht die Membran ebenfalls entlang eines Gradienten zu passieren. Der Öffnung eines Kanals können allerdings diverse Mechanismen zugrunde liegen. So sind mechanischgesteuerte, spannungsgesteuerte, aber auch hormongesteuerte Kanäle bekannt. Zu den passiven Transportvorgängen zählt auch die „erleichterte“ Diffusion, die mittels Carrierproteinen den Transport ermöglicht. In den meisten Fällen wird der Vorgang durch eine Substrat-induzierte Konformationsänderung des Carrierproteins gestartet. Durch einen Uniport wird ein einzelner Stoff transloziert, wohingegen sowohl beim Symport in gleicher Richtung als auch bei Antiport in entgegengesetzter Richtung zwei Stoffe gleichzeitig transportiert werden. Das bekannteste Beispiel für einen Symport ist der gleichzeitige Transfer von Glucose und Natrium in die Epithelzellen des Darmes. Transportvorgänge unter Zufuhr von Energie, meist durch Hydrolyse von ATP, aber auch oft durch den Abbau eines Konzentrationsgradienten, stellen die Möglichkeiten des „aktiven“ Transports dar. Sinn und Zweck der aktiven Transportvorgänge ist der Transfer von Molekülen gegen einen Konzentrations- bzw. Ionengradienten. Diese Art von Transport ist sehr wichtig, um z. B.

Membranpotentiale aufrecht zu erhalten, die eine neuronale Signalweiterleitung, aber auch die Fähigkeit zur Muskelkontraktion gewährleisten.^{1,3}

1.2 Translokation von Proteinen

In Eukaryonten gestaltet sich der Transport speziell von Proteinen als sehr vielseitig. Teilweise findet die Biosynthese der Proteine ebenso wie bei Prokaryonten an freien Ribosomen im Cytoplasma der Zelle statt, aber viele Proteine werden auch an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Da sie je nach Bedarf in verschiedenen Kompartimenten der Zelle benötigt werden und dies nicht möglich ist ohne eine oder mehrere Membranen zu passieren, können die Proteine oftmals nur mittels komplizierter Transportsysteme an ihren Wirkort gelangen. Proteine werden dabei als Präkursorproteine biosynthetisiert. Diese bestehen in den meisten Fällen aus dem endgültigen Protein, das mit einer N-terminal anhaftenden Signalsequenz versehen ist, die wiederum sowohl die Route und Effizienz als auch das Transportziel festlegt. Nach erfolgter Translokation wird das Signalpeptid häufig durch Signalpeptidasen vom Zielprotein abgeschnitten.^{4,5} Die Zusammensetzung der Transportpore gestaltet sich von einem Transportsystem zum anderen unterschiedlich und ist meist ein Multiproteinkomplex, der das eigentliche Überwinden der hydrophoben Barriere bewerkstelligt. Die wohl bekannteste Proteintranslokase stellt hier der Sec-abhängige Transportmechanismus, der in nahezu jedem Prokaryonten auftritt, dar. Ein homologes System findet sich aber ebenfalls beim eukaryontischen Proteintransport im endoplasmatischen Retikulum.⁶ Bei allen prokaryontischen Einzellern ohne Organellen müssen viele Proteine ins Periplasma (bei Gram-negativen Bakterien) bzw. außerhalb der Zelle (bei Gram-positiven Bakterien) gelangen, um dort deren Umgebung zu gestalten. Beim Sec-abhängigen Membrantransport von Proteinen in Bakterienzellen wird nach der Translation die Faltung des naszierenden Proteins durch den Targetingfaktor SecB verhindert. Nach erfolgreichem Kontakt mit dem membranassoziierten SecA befähigt eben dieses das Protein unter ATP-Hydrolyse die SecYEG-Pore und somit die Lipiddoppelschicht zu passieren. Im Gegensatz zum vorangegangenen Beispiel einer posttranslationalen Translokation sind auch cotranslationale Sec-abhängige Transportmechanismen bekannt.^{5,7} Komplikationen entstehen bei der Sec-abhängigen Translokase, wenn große oder sich schnell faltende Proteine transportiert werden sollen. Hinzu besitzen viele Proteine einen Cofaktor, der

meistens nur von der gefalteten Konformation gebunden werden kann. Um somit einen aktiven Protein-Cofaktor-Komplex nach erfolgtem Transport zu erhalten, muss der Cofaktor separat durch die hydrophobe Barriere geschleust werden. Mould und Robinson entdeckten jedoch ein weiteres Proteintransportsystem über die Thylakoidmembran von Chloroplasten, das die Proteine im gefalteten Zustand sekretieren kann und sich als Energiequelle einzig des pH-Gradienten über der Lipiddoppelschicht bedient.^{4,8,9}

1.3 Tat-abhängiger Proteintransport

Namensgebend für diesen von Mould und Robinson entdeckten Transport ist das hochkonservierte Doppel-Arginin-Motiv in der Signalsequenz des *twin arginine translocation* (Tat) Systems.⁸ Die fundamentale Bedeutung des Doppel-Arginin-Motivs bei der Erkennung des Signalpeptids durch die Membrankomponenten der Translokase konnte durch ortsspezifische Mutagenese gezeigt werden. Jedoch konnten neben dem klassischen Motiv auch weitere natürliche Varianten des Tat-Signalpeptids mit einem Arginin-Glutamin-Motiv in Streptomycceten detektiert werden.^{10,11} Des Weiteren konnte für den Tat-Transportapparat gezeigt werden, dass dieser auch ohne die Möglichkeit der ATP-Hydrolyse seine translozierende Eigenschaft nicht verliert. In anderen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass durch ein Auflösen des pH-Gradienten mittels des Ionophors Nigericin der Proteintransport nicht zu beobachten ist und daher die protonenmotorische Kraft über die Zellmembran die entscheidene Energiequelle der Translokation darstellen muss.^{12,13} Durch verschiedene Experimente konnte auch der zuvor erwähnte Vorteil gegenüber dem Sec-abhängigen Transportsystem, Proteine in ihrer gefalteten Konformation transportieren zu können, bestätigt werden. Ein Beispiel hierfür ist der Transport eines Fusionsproteins aus dem gefalteten, grünfluoreszierenden Protein (GFP) und einem Tat-Signalpeptid über den Tat-abhängigen Translokationsweg ohne dabei eine Membranschädigung hervorzurufen.¹⁴ Ebenso konnte der Tat-abhängige Transport eines Fusionsproteins aus Cytochrom c mit seiner inserierten prosthetischen Häm-Gruppe und einem Tat-abhängigen Signalpeptid gezeigt werden.¹⁵ Da Cytochrom c seine prosthetische Häm Gruppe nur im gefalteten Zustand binden kann, konnte mit dieser Studie sowohl die Fähigkeit von Tat-Systemen gefaltete Proteine als auch Proteine mit gebundenem Cofaktor zu transportieren gezeigt werden (siehe Abb. 1). Neben Cytochrom c können Tat-

Systeme die unterschiedlichsten heterologen Proteine transportieren. Beispiele hierfür sind Proteine mit Nukleotiden (NADH, FADH₂), mit redox-aktiven Cofaktoren, aber auch gefaltete Proteine ohne Cofaktoren wie z. B. die Phosphodiesterase aus *B. subtilis* (PhoD), das Substrat, des in dieser Studie untersuchten Tat-abhängigen Transportapparates.^{16,17} Tat-abhängige Transportsysteme finden aber auch in anderen Bereichen zellulärer Stoffwechselprozesse wichtige Verwendungen.¹⁸ So sind sie unter anderem beteiligt an der Zellatmung^{19,20}, an der Zellwandsynthese²¹⁻²³ und auch bei Biofilm-Ausbildungen^{24,25}. Bereits Archaea, die zu den ältesten Einzellern der belebten Welt zählen, bedienen sich des Tat-abhängigen Transports.^{26,27} Da viele von ihnen Extremophile sind, ist es von Vorteil, wenn die translozierten Proteine, sobald sie mit den extremen Umweltbedingungen in Kontakt kommen, bereits in ihrer biologisch aktiven Form vorliegen. Die meisten Lebensräume dieser Archaea würden ein ungefaltetes Protein beim ersten Kontakt sehr schnell denaturieren bzw. zerstören.^{28,29} In manchen Fällen des Tat-abhängigen Transports wird das entsprechende Protein nicht sezerniert, sondern der Tat-Apparat verhilft dem Protein in die Membran zu insertieren oder das Substrat verankert sich in dieser mittels der N-terminalen Signalsequenz.^{20,30}

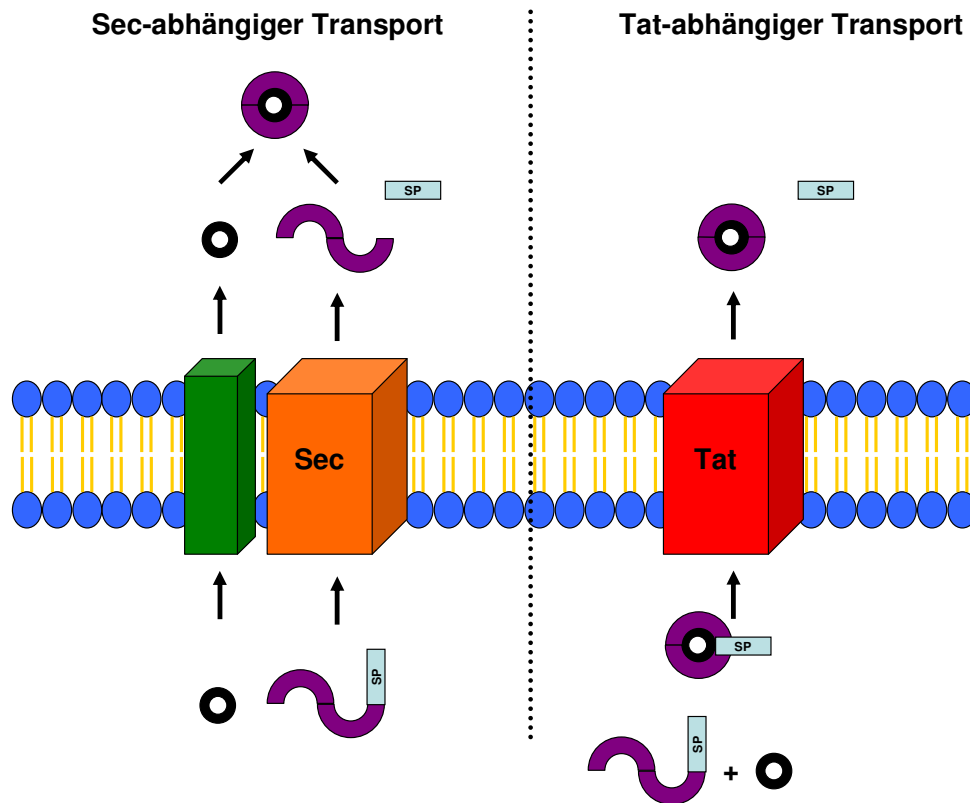


Abbildung 1: Sec- und Tat-abhängigen Transport eines periplasmatischen Proteins mit Cofaktor. Im Fall des Sec-abhängigen Transports wird eine separate Pore für den Cofaktor benötigt, der diesen ins Periplasma transportiert. Die Faltung und anschließende Insertion des Cofaktors kann beim Tat-abhängigen Translokationsapparat bereits im Cytoplasma stattfinden, so dass der gesamte Protein-Cofaktor-Komplex ins Periplasma transportiert wird. (Der schwarze Kreis stellt den Cofaktor da, die violetten Linien das Protein und das blaue Rechteck das Signalpeptid.) Grafik verändert nach [16].

1.3.1 Komponenten des Tat-abhängigen Transports

Neben dem zuerst entdeckten Tat-abhängigen Transport über Thylakoidmembranen in Pflanzenzellen findet sich eine Vielzahl von Tat-Systemen in unterschiedlichen Bakterien. Der Tat-abhängige Translokationsapparat unterscheidet sich hierbei in unterschiedlichen Bakterienstämmen in der Anzahl der beteiligten Komponenten. Ausführliche Studien liegen für *E. coli*, ein Gram-negatives Bakterium, vor. Hierfür wurden jeweils analoge Komponenten zum bereits bekannten Tat-abhängigen Transport in Chloroplasten entdeckt. Für die Membrankomponente TatA von *E. coli* konnte Tha4 (*thylakoid assembly 4*)^{31,32}, für TatB Hcf106 (*high-chlorophyll fluorescent 106*)^{32,33} und für TatC cpTatC (*chloroplast TatC*)^{34,35} jeweils als Homolog zum Tat-Transport in Thylakoiden gefunden werden.^{31,34,35} Es konnte zudem ein weiteres Gen für das Protein TatD auf dem gemeinsamen Operon *tatABCD* gefunden werden, dem eine

cytoplasmatische DNase-Funktion zugeschrieben wird. Hingegen ist das wahrscheinlich durch Genduplikation von TatA entstandene TatE, das auf einem getrennten Gen liegt, durch eben TatA ersetzbar, da beide eine überlappende Funktion besitzen.³⁶ Diese Tatsache ergibt sich aus der Aminosäuresequenzhomologie von ca. 50 %.³⁷ Dennoch wird der Transport durch das Fehlen eines der beiden Proteine verlangsamt.^{16,17,36,38,39} In dem Bakterium *E. coli* nehmen TatB und TatC eine essentielle Rolle ein. Der Transport kommt durch Abwesenheit eines dieser Membranproteine vollständig zum Erliegen. Ebenso ist ein Transport ohne das TatA Protein nicht möglich.^{17,40-43} Mittels Sequenzanalysen konnte des Weiteren eine große Ähnlichkeit der Sekundärstrukturen der Proteine TatA, TatB und TatE vorhergesagt werden. Demnach folgt einer N-terminalen transmembranen α -Helix eine amphipathische, zur Membranoberfläche eher parallele, α -Helix. Die restlichen C-terminalen Aminosäuren wurden als unstrukturiert charakterisiert.^{10,16,44} Ob sich die N- bzw. C-Termini eher auf der cytoplasmatischen Seite der Membran befinden oder im periplasmatischen Raum konnte noch nicht abschließend geklärt werden. So wird eine „N-inside“ Topologie durch Zugänglichkeitsexperimente bekräftigt⁴⁵, wohingegen der protolytische Verdau der amphiphilen Helix von der cytosolischen Seite den gegenteiligen Standpunkt unterstreicht.⁴⁴ Aufgrund der vielen hydrophoben Aminosäuren in der Sequenz von TatC und dem hohen α -helikalen Sekundärstrukturanteil⁴⁶ wurden ca. sechs transmembrane Helices für dieses Membranprotein vorhergesagt. Im Fall dieser Komponente der Translokase wird angenommen, dass sowohl N-Terminus als auch C-Terminus auf der Seite des Cytoplasmas herausragen (siehe Abb. 2).^{47,48}

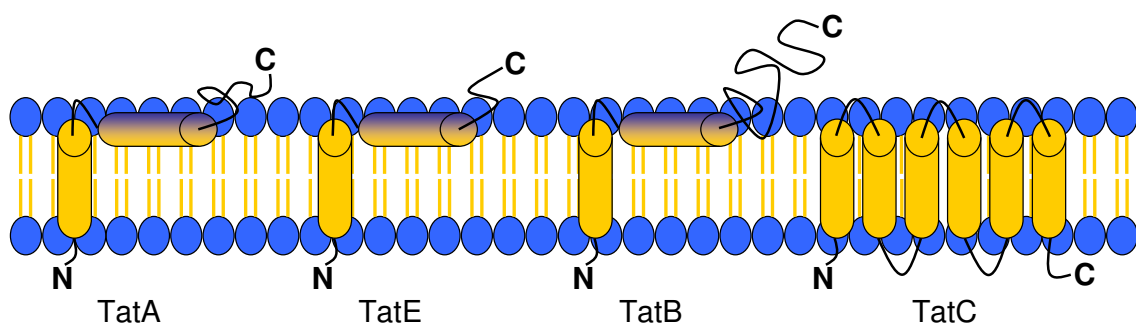


Abbildung 2: Vermutete Topologie der *E. coli* Tat-Komponenten in der Membran.¹⁶ TatA, TatB und TatE besitzen alle eine N-terminale, transmembrane α -Helix, gefolgt von einem amphipathischen α -helikalen Abschnitt. Die folgende C-terminale Sequenz ist wahrscheinlich unstrukturiert. Die Sequenz von TatC beinhaltet sechs transmembrane α -Helices. N-Terminus und C-Terminus liegen auf derselben Seite. In welche Richtung der N-Terminus der Proteine zeigt ist nicht abschließend geklärt.

Mehrere unterschiedliche Aspekte sprechen dafür, dass TatA die porenbildende Komponente darstellt. TatA wird zum einen im Vergleich zu den anderen Membrankomponenten in weit höherem Maß exprimiert (Expressionsrate in *E. coli* : TatA/TatB/TatC = 25:1:0,5)^{16,49}, zum anderen konnte die Fähigkeit der spontane Zusammenlagerung der TatA Monomere gezeigt werden.⁵⁰ Da ringförmige TatA-Komplexe unterschiedlicher Größe durch elektronenmikroskopische Experimente detektiert werden konnten, wird zusätzlich eine dynamische Oligomerisierung von TatA vermutet, was wiederum eine Anpassung der Pore an das zu transportierende Substrat ermöglichen würde.⁵¹ Der zweiten Membrankomponente TatB wird vermutlich die Rolle als Bindeglied zwischen TatA und TatC zuteil und bildet mit TatC einen für den Transport unerlässlichen Komplex.⁵²⁻⁵⁴ Elektronenmikroskopische Experimente ermöglichten die Identifikation eines TatBC-Komplexes, an den wenige TatA Moleküle gebunden hatten.⁵⁵ Da für das TatC Protein gezeigt werden konnte, dass es eine wichtige Funktion bei der Erkennung und gleichzeitigen Bindung des Signalpeptids besitzt⁵⁶⁻⁵⁸, verbindet der TatBC-Komplex somit die aus TatA Molekülen aufgebaute Translokationspore mit dem Substrat dieses Tat-abhängigen Transports.

1.3.2 Tat-abhängiger Transport in *B.subtilis*

Unter natürlichen Bedingungen wird das Wachstum des Bodenbakteriums *B. subtilis* stark vom Angebot an anorganischem Phosphat bestimmt. Ein empfindliches Signaltransduktionssystem ermöglicht es dem Bakterium die Phosphatkonzentration in seiner Umwelt zu bestimmen. Beim Vorhandensein einer gewissen Schwellenkonzentration an Phosphat reagiert *B. subtilis* mit einer zellulären Antwort und beginnt dieses aktiv zu metabolisieren, um vorhandene zelleigene Ressourcen zu entlasten.⁹

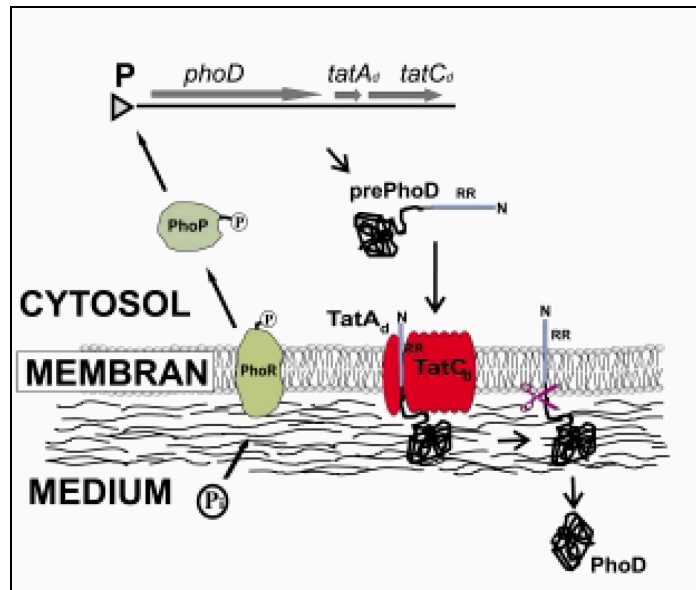


Abbildung 3: Regulation der Expression von PhoD in *B. subtilis* (siehe Text).⁹

Zwei Komponenten dieses PhoD-Systems sind an der Signalweiterleitung beteiligt. Das Enzym PhoR, eine Histidin-Protein-Kinase, besitzt die Aufgabe eines Sensorproteins (siehe Abb. 3).

Als integrales Membranprotein sendet das PhoR bei einer verminderten Phosphatkonzentration (P_i) im Medium ein Phosphathungersignal ins Innere der Zelle. Durch Phosphorylierung des Regulatorproteins PhoP im Cytosol wird die Expression alkalischer Phosphatasen und Phosphodiesterasen induziert. Ein Beispiel ist die Phosphodiesterase PhoD, deren Tat-abhängiger Transport das Untersuchungsobjekt dieser Arbeit darstellt. Gleichzeitig zur Expression der Phosphatasen wird ein Phosphataufnahmesystem exprimiert und mehrere Enzyme, die katalytisch auf die Biosynthese von Teichuronsäure wirken. Teichuronsäure ersetzt bei Phosphatmangel Polyglycerolphosphat-Teichuronsäure als anionische Einheit in der Zellwand des Bakteriums. Dies ermöglicht *B. subtilis* den Phosphatbedarf um bis zu 40 % zu senken.^{4,9} Der Transport von PhoD in *B. subtilis* ist ein Beispiel für den Tat-abhängigen Transport einer sekretorischen Phosphodiesterase. Die Gene der porenbildenden Membranproteine TatA_d und TatC_d liegen gemeinsam mit PhoD auf einem Operon. PhoD wird als Präkursorprotein mit einem N-terminalen Signalpeptid exprimiert. Nach dem Transport mit Hilfe der beiden Membranproteine verweilt PhoD eine Weile an der Außenwand der Zellmembran, höchstwahrscheinlich um an seinem Wirkort fixiert zu sein.⁴ Nach dem Aufenthalt an der Lipiddoppelschicht wird das Signalpeptid von Signalpeptidasen abgespalten und PhoD wird freigesetzt.⁴ Neben dem Transport von PhoD existiert in *B. subtilis* eine weitere Tat-abhängige

Translokase, die ebenso mit nur zwei Membrankomponenten funktionsfähig ist, im Vergleich zu Sekretion in *E.coli*, bei der vier Komponenten beteiligt sind. Die beiden Membrankomponenten sind bei diesem Gram-positiven Bakterium Homologe zu TatA und TatC in *E. coli*.¹² Wie schon erwähnt, liegt die Besonderheit in der Häufigkeit der einzelnen Komponenten. In *B. subtilis* wurden zwei TatC- und drei TatA-Gene gefunden. Zwei TatA/TatC-Paare ermöglichen dabei je einen spezifischen Tat-abhängigen Transport für unterschiedliche Proteine des Organismus. Die Phosphodiesterase PhoD wird von dem Enzym-Paar TatA_d und TatC_d transportiert, hingegen sind TatA_y und TatC_y für den Transport des Proteins YwbN, einer Fe-abhängige Peroxidase^{59,60}, verantwortlich.⁴ Die Spezifität dieses Translokationsapparates konnte durch die Inaktivierung des TatC_d-Gens gezeigt werden, wodurch der Transport von PhoD in *B. subtilis* zum Erliegen kam. Ein Ausschalten des TatC_y-Gens hatte hingegen keinen Einfluss auf die Translokationsrate von PhoD. Die Aufgabe von TatA_c, dem dritten TatA-Analog, konnte bislang nicht geklärt werden. TatB ähnliche Proteine, die unerlässlich in den Tat-abhängigen Transportsystemen von *E. coli* und denen in Chloroplasten über Thylakoidmembranen sind, werden in den *Bacillus*-Stämmen nicht benötigt und sind nicht vorhanden. In *B. subtilis* liegen die Gene für TatA_d und TatC_d in Folge hinter dem Gen für PhoD auf einem gemeinsamen Operon. Dies hat zur Folge, dass alle drei Proteine coreguliert synthetisiert werden. Auch diese Tatsache zeigt die Spezifität dieses Systems, ebenso wie Experimente in *E.coli*. Die Tat-abhängige Translokase von *E.coli* war nicht befähigt den in *E.coli* exprimierten Präkursor prePhoD von *B. subtilis* zu transportieren. Werden hingegen alle benötigten Komponenten des Systems exprimiert, findet der Membrantransport der Phosphodiesterase von *B. subtilis* in *E.coli* problemlos statt.^{4,10,16} Eine entscheidende Rolle bei allen Tat-abhängigen Transporten besitzen jedoch die Signalpeptide, weshalb im nächsten Kapitel genauer auf diese eingegangen wird.

1.3.3 Tat-abhängige Signalpeptide

Fast alle cytoplasmatischen Proteine werden in Bakterien als Präkursoren mit einer N-terminal anhängenden Aminosäuresequenz, dem sogenannten Signalpeptid, exprimiert. Von diesen wird im Wesentlichen der Zielort, die Transportroute und die Effizienz der Sekretion festgelegt, was anhand von Fusionsexperimenten gezeigt werden konnte.^{4,5} Dass der Transport der Phosphodiesterase PhoD, versehen mit

dem dazugehörigen Signalpeptid, unter Anwesenheit aller benötigten Komponenten, TatA_d und TatC_d, auch in Fremdorganismen realisierbar ist, wurde bereits erwähnt. Eine Studie mit weiteren Fusionspeptiden ermöglichte eine noch tiefere Einsicht in die Fähigkeiten des Tat-abhängigen Transports (siehe Abb. 4). Ein Fusionspeptid aus PhoD und dem Sec-abhängigen Signalpeptid der β-Lactamase wurde Sec-abhängig transloziert. Anhand dieses Experiments konnte die Bestimmung des Transportweges durch das Signalpeptid und nicht durch das zu transportierende Substrat gezeigt werden. Beim Versuch ein durch Genfusion erstelltes Protein aus einer Sec-Signalsequenz und der sich schnell faltenden, großen β-Galactosidase (LacZ) zu transportieren, wurde der erwartete Sec-abhängige Transport kaum beobachtet. Der Tat-abhängige Transport dieses Proteins wurde nicht erwartet und auch nicht beobachtet. Eine plausible Erklärung hierfür ist die Verstopfung der Sec-Translokationspore, wodurch es auch nach kurzer Zeit zum Zelltod kommen kann, durch das LacZ-Protein, das normalerweise Tat-abhängig exportiert wird. Die β-Galactosidase fusioniert mit einer Tat-Signalsequenz ließ sich entsprechend ohne negative Auswirkung auf den Organismus transportieren. Durch diese Experimente konnte die Spezifität und weiterhin die Besonderheit des Tat-abhängigen Transports, große und schnell faltende Proteine zu exportieren, eindeutig gezeigt werden.⁴

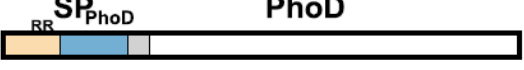
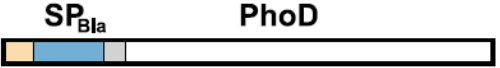
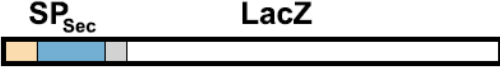
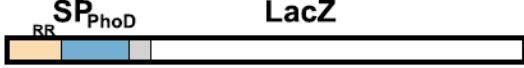
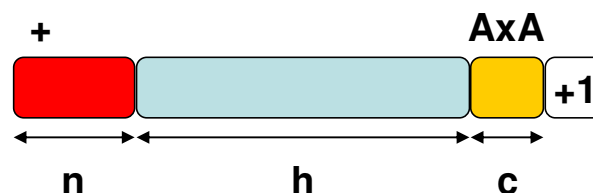
	Signalpeptid	Protein	Transportweg des Hybridproteins	
			Sec-abhängig	Tat-abhängig
A		PhoD	-	+
B		PhoD	+	-
C		LacZ	(-)	-
D		LacZ	-	+

Abbildung 4: Auswertung des Transports verschiedener Hybridproteine im Überblick.⁴

Die verschiedenen Signalpeptide unterscheiden sich teilweise stark in ihrer Aminosäuresequenz voneinander, aber sowohl bei Sec-abhängigen als auch bei Tat-abhängigen Signalpeptiden ist im Vergleich miteinander ein übergeordneter, gesamtheitlicher Aufbau zu erkennen. In den Signalsequenzen können drei verschiedene Domänen charakterisiert werden. Der N-terminale Bereich weist

meistens eine oder mehrere positiv geladene Aminosäuren auf. Oft sind die Aminosäuren Arginin und Lysin in dieser „n-Domäne“ zu finden. Es wird von diesem Abschnitt eine elektrostatische Interaktion der positiv geladenen Aminosäuren des Signalpeptids mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide der Zellmembran vermutet. Der darauf folgende hydrophobe Bereich (h-Domäne) nimmt oftmals eine α -helikale Sekundärstruktur ein. In den meisten Fällen besitzt der wiederum darauf folgende C-Terminus (c-Domäne) die Erkennungssequenz A-x-A für die Signalpeptidasen, die nach erfolgtem Transport die Signalsequenz vom Substrat abtrennen und dieses freisetzen.⁴

Sec-Signalsequenz



Tat-Signalsequenz

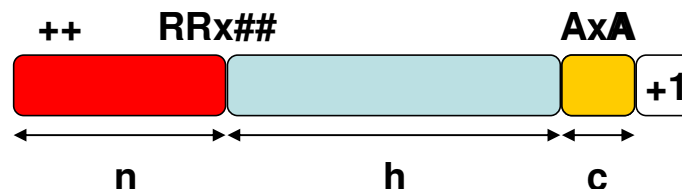


Abbildung 5: Schema einer Signalsequenz des Sec- und Tat-abhängigen Transports.

Trotz des ähnlichen Aufbaus gibt es einige signifikante Unterschiede in den unterschiedlichen Domänen der Sec- und Tat-abhängigen Signalpeptide (siehe Abb. 5). Beide variieren in der Anzahl Aminosäuren, aus denen sie aufgebaut sind. Im Fall der Sec-abhängigen Signalsequenzen wird eine Länge von 18-26 Aminosäuren benötigt, wohingegen die Tat-abhängigen Signalpeptide etwas länger sind und aus 28-58 Aminosäuren aufgebaut sind.⁶¹ Einer der wichtigsten und offensichtlichsten Unterschiede stellt das hochkonservierte und für das Tat-System namensgebende Motiv **S/T-R-R-x-F-L-K** an der Grenze der N-terminalen Domäne zum hydrophoben Bereich dar, das in Sec-abhängigen Signalpeptiden nicht in dieser Form vorkommt. Abgesehen vom Zwillings-Arginin-Motiv (RR) scheint auch das darauf folgende Phenylalanin (F) oft eine wichtige Rolle bei der Erkennung der

porenbildenden Komponenten und deren Akzeptanz gegenüber dem Präkursor einzunehmen. Werden beide Arginine (RR) durch Lysine (KK) ersetzt führt dieser Austausch meistens zu einer vollständigen Blockade, während lediglich die Effizienz vermindert wird, wenn nur an einer Stelle ein Arginin-Austausch (RK, KR) stattfindet. Der Austausch des Phenylalanins gegen eine weniger hydrophobe Aminosäure schwächt ebenfalls die Translokase-Aktivität ab. Aus der zusätzlichen Wichtigkeit von Leucin und Lysin für die Substraterkennung wird ersichtlich, dass das gesamte Konsensusmotiv eine Auswirkung auf den Tat-abhängigen Transport besitzt.^{56,62,63} Durch Klonierung eines Tat-Motivs in die Signalsequenz eines Sec-abhängigen Transportsystems, konnte gezeigt werden, dass das Konsensusmotiv nicht alleine für den Transport verantwortlich sein kann. Weder konnte ein Targeting zum Translokationsapparat des Tat-Systems beobachtet werden, noch wurde die Sec-abhängige Sekretion blockiert.^{64,65} Ein weiterer Unterschied der Sec- und Tat-abhängigen Signalpeptide zeigt sich in der vermutlich α -helikalen, hydrophoben Domäne. Tat-Signalpeptide weisen in diesem Bereich eine niedrigere Hydrophobizität auf. In einem Experiment mit einem Fusionsprotein aus dem Tat-abhängigen Signalpeptid der TMAO-Reduktase und der löslichen Domäne der Sec-abhängigen Leaderpeptidase konnte durch Erhöhung der Hydrophobizität der H-Domäne ein Sec-abhängiger Transport induziert werden.⁶⁶ Dieser Sachverhalt kann aber auch als Absicherung für Tat-abhängige Signalpeptide angesehen werden, da die meisten Tat-Translokationssysteme eine verminderte Hydrophobizität im Vergleich zu Sec-abhängigen Systemen besitzen. Hierdurch könnte der Transport von Proteinen, die mit einer Tat-Signalsequenz ausgestattet sind, über den Sec-Weg unterbunden werden. Da jedoch vergleichsweise stark hydrophobe Tat-Signalpeptide existieren, die dennoch nicht mit vorhandenen Sec-Translokasen interagieren, muss es zusätzliche Faktoren zur Verhinderung geben.⁶⁶ Die meisten Sec-abhängigen Signalsequenzen besitzen keine positiv geladenen Aminosäuren in ihrer C-terminalen Domäne. Im Fall der Tat-Signalpeptide sind positiv geladene Aminosäuren in dieser Region eher die Regel. In Abbildung 6 sind einige Tat-abhängige Signalpeptide aus *B.subtilis* und *E.coli* mit ihrer Konsensussequenz übereinander aufgelistet, um die globalen Gemeinsamkeiten zu verdeutlichen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der Tat-abhängige Transport von stark hydrophoben Tat-Substraten durch Eliminierung der positiven Ladungen im C-Terminus der Tat-Signalpeptide in den Sec-abhängigen Transportweg umgeleitet

werden konnte. Diese Erkenntnis führte dazu, dass diese speziellen positiv geladenen Aminosäuren als „Sec-Avoidance“-Motiv bezeichnet werden.⁶⁷ Die Schlussfolgerung aus diesen Experimenten ist, dass der Sec- und Tat-abhängigem Transport nur ungenau getrennt werden kann. Kleine Veränderungen der Aminosäuresequenz der Tat-Signalpeptide führen oft zum Sec-abhängigen Transport der entsprechenden Präkursoren. Der Export durch eine Tat-Translokase mittels einer Sec-abhängigen Signalsequenz konnte bisher jedoch nicht beobachtet werden. Abgesehen von der detaillierten Aminosäureabfolge und dem Zwillingsarginin-Motiv scheint auch die Konformation der Sekundärstruktur eine wichtige Funktion einzunehmen. Mit synthetisch erzeugten Tat-Signalpeptiden, denen das Doppelarginin-Motiv (RR) durch ein Doppelalanin-Motiv (AA) ersetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass sich die Sekundärstruktur nicht ändert.⁶⁸ Ein erheblicher Einfluss auf die Konformation der Sekundärstruktur war jedoch bei einer Variation der Umgebung zu beobachten. Die jeweiligen Signalpeptide wurden zum einen in einer wässrigen Lösung vermessen, die die polare Umgebung im Cytosol nachahmt, zum anderen wurden Messungen in Trifluorethanol (TFE) durchgeführt, dessen Hydrophobizität die Umgebung einer Membran imitiert. Die Messung in wässriger Lösung ergab eine ungeordnete Sekundärstruktur (random-coil), wohingegen eine α -helikale Konformation für die Experimente in TFE festgestellt werden konnte. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass TFE tendenziell α -helikale Bereiche begünstigt, diese Konformation einzunehmen. Diese Ergebnisse lassen trotzdem durchaus die Vermutung zu, dass gewisse Abschnitte mancher Signalpeptide in der Nähe von Membranen eine α -helikale Struktur einnehmen.⁶⁸

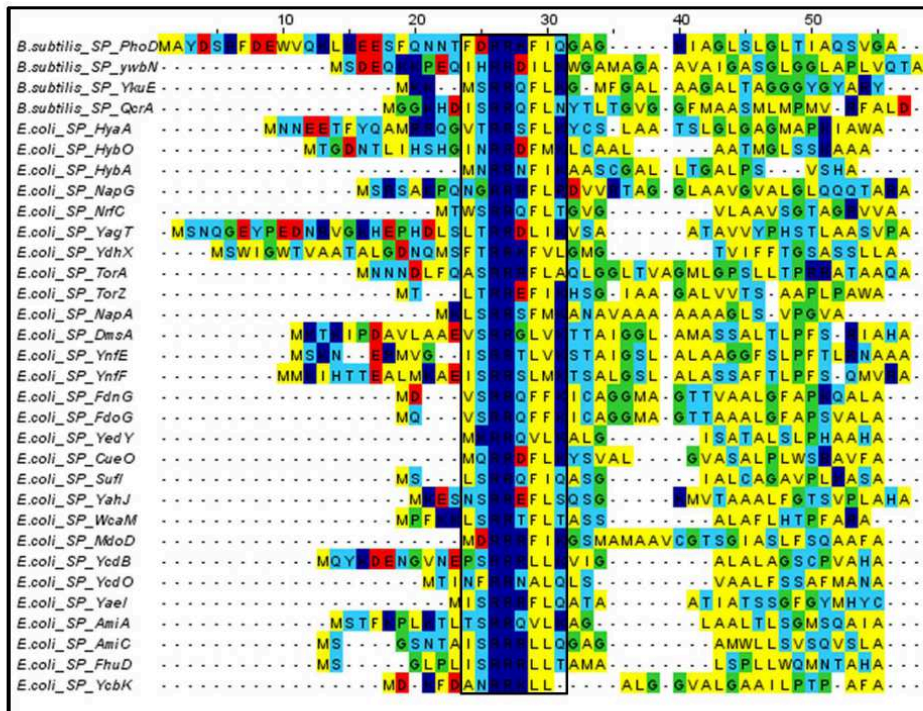


Abbildung 6: Sequenz-Alignment Tat-abhängiger Signalpeptide aus *B. subtilis* und *E. coli*. Zur Erstellung des Sequenzalignments wurden die Programme ClustalW⁶⁹ und Jalview⁷⁰ verwendet. Die schwarze Box markiert die Konsensussequenz. Der Farbcode der Aminosäuren wurde folgendermaßen gewählt: gelb - 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). (Dissertation Torsten Walther, KIT-Karlsruhe, 2010)

In der Literatur findet sich die weitverbreitete Meinung, dass Signalpeptide aufgrund ihrer positiv geladenen Aminosäuren in der N-terminalen Domäne mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Lipide interagieren können.⁷¹ Ebenso können vermutlich ganze Abschnitte von Signalpeptiden aufgrund ihrer Sekundärstruktur und ihrer Aminosäuresequenz neben der elektrostatischen eine weitere Wechselwirkung mit der Membran eingehen. Oft wird diese Interaktion, die durch die Insertion einer hydrophoben Helix in die Lipiddoppelschicht stattfindet, als zweiter Schritt der Anlagerung an die Membran angesehen.⁷² Mittels Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie wurde von *Shanmugham et al.* ein Modell für die ersten Schritte der Proteintranslokation von bestimmten Präkursoren basierend auf elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen erstellt.⁷³ Ebenso konnte für *E. coli* Proteine der äußeren Membran, die Sec-abhängig transportiert werden, eine Membraninteraktion basierend auf beiden Wechselwirkungen gezeigt werden.⁷⁴⁻⁷⁶ Die hydrophobe Interaktion findet hier wie in den meisten Fällen mittels einer hydrophoben Helix statt.⁷⁷ Des Weiteren können α -helikale Sekundärstrukturen aber auch in Form von amphiphilen Helices mit der Membran in Interaktion treten. Es ist

bekannt, dass die meisten mitochondrialen Präsequenzen eine α -helikale Sekundärstruktur einnehmen und oftmals einen amphiphilen Charakter innehaben. Weiterhin konnte jedoch gezeigt werden, dass die Amphiphilizität essentiell für den Kontakt zur Membran ist und die α -Helicität in diesem Fall nebensächlich.⁷⁸ Hinzu wurde bei den mitochondrialen Präsequenzen eine stärkere Interaktion mit den Proteinen der äußeren Membran als mit den Lipiden selbst detektiert.⁷⁹ Dennoch sind Bindungen mittels einer amphiphilen α -Helix sehr wohl von u. a. antimikrobiellen Peptiden bekannt, auch wenn der Mechanismus hier ein anderer sein kann.^{80,81} Das Signalpeptid von PhoD aus *B. subtilis* trägt sowohl positiv als auch negativ geladene Aminosäuren in der N-terminalen Domäne, daher ist es fraglich, ob elektrostatische Wechselwirkungen alleine für den ersten Schritt der Bindung an die negativ geladene Bakterienmembran verantwortlich sind. Der genaue Ablauf dieser ersten Schritte und auch die mögliche Interaktion mittels einer hydrophoben Helix wurden für diese Tat-abhängige Translokase noch nicht genauer untersucht. Um ein besseres Verständnis dieses im Vergleich zum bekannten Sec-Transport besonderen Systems aus *B. subtilis* zu erlangen, wurden einzelne Vorgänge dessen in dieser Arbeit genauer untersucht.

2 Aufgabenstellung

Der Tat-abhängige Translokationsapparat von PhoD aus *B.subtilis* ist im Vergleich zu anderen Tat-abhängigen Proteintranslokasen aufgrund der verringerten Anzahl an Komponenten ein recht überschaubares System. Dennoch kann bisher über die genaue Funktionsweise nur spekuliert werden, da sich die aktuelle Forschung eher auf die Strukturaufklärung der Membrankomponenten konzentriert.

Um den Mechanismus dieses Transports besser zu verstehen, sollte in dieser Arbeit

- die Wechselwirkung des Signalpeptids mit der Membran
- die Wechselwirkung der Komponente TatA_d mit der Membran
- und die Interaktion der Komponenten in der Membran untereinander genauer untersucht werden.

Um diese Ziele zu erreichen, sollten

- am Signalpeptid
 - Zirkulardichroismus-Messungen (CD) durchgeführt werden, um globale Sekundärstrukturinformationen für Bindungsmotive an Membranen ausfindig zu machen.
 - orientierte Zirkulardichroismus-Untersuchungen (OCD) erfolgen, um die Orientierung der gefundenen α -helikalen Anteile bezüglich der Membran bestimmen zu können.
 - Flüssigkeits-NMR-spektroskopische Experimente zur exakten Detektion der Sekundärstrukturelemente in der Aminosäuresequenz stattfinden, um hieraus ein Modell für die ersten Bindungsschritte zu entwickeln.
- ²H-Festkörper-NMR-Untersuchungen mittels Kopfgruppen-deuterierten Lipiden durchgeführt werden, um den Einfluss des porenbildenden TatA_d-Proteins auf die Lipiddoppelschicht aufzuzeigen.
- Neutronenstreuungsexperimente erfolgen, um einen Einblick in die Wechselwirkung der Komponenten des Tat-Systems untereinander zu gewinnen.

Durch ein besseres Verständnis der Wechselwirkung der Komponenten mit der Membran bzw. mit sich selbst könnten gewinnbringende Informationen über den gesamten Wirkmechanismus erhalten werden.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen am Signalpeptid von PhoD

3.1.1 Expression, Aufreinigung und Charakterisierung des Signalpeptids von PhoD

Zur Erzeugung des Signalpeptids von PhoD aus dem Bakterium *B. subtilis* wurde das SP-Gen durch PCR vervielfältigt. Hierzu wurden Primer mit den Restriktionsschnittstellen NdeI und XhoI auf den Vektor pQE9PhoD angewendet. Das resultierende Produkt wurde mit den Enzymen NdeI und XhoI geschnitten und in den Vektor pET28a(+) kloniert. Zusätzlich wurde eine Thrombin-Schnittstelle vor dem C-terminalen His-Tag eingeführt, was zu dem Plasmid pET28a(+) SP-His führte. Das daraus resultierende Protein mit abspaltbarem C-terminalen His-Tag besitzt folgende Aminosäuresequenz:

MAYDSRFDEW¹⁰ VQKLKEESFQ²⁰ NNTFDRRKFI³⁰ QGAGKIAGLS⁴⁰
LGLTIAQSVG⁵⁰ AFEVNALVPR⁶⁰ GSLEHHHHHH⁷⁰

Die Transformation des Plasmids in den *E. coli* Expressionstamm BL21 (DE3) bzw. BL21 (DE3) pLys ermöglichte eine Expression des Proteins sowohl unmarkiert in LB-Medium als auch uniform ¹⁵N, ¹³C-markiert in M9-Minimalmedium. Zur Expression des ¹⁵N, ¹³C-markierten Proteins wurde dem M9-Minimalmedium 2 g/L ¹⁵NH₄Cl und 2 g/L ¹³C- α -D-Glukose als einzige Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle zugesetzt. Das Wachstum der Zellen erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 37°C bis zu einer optischen Dichte der Kultur von OD₆₀₀ = 0,6-0,8. Die Proteinexpression wurde dann durch Zugabe von 0,5 mM IPTG gestartet. Die Expression wurde nach 24 h gestoppt, da zu diesem Zeitpunkt die maximale Expressionsrate erreicht war (siehe Abb. 7). Abzentrifugation der Zellkultur zu diesem Zeitpunkt verhinderte Degradierung des Proteins mangels vorhandener Nährstoffe.

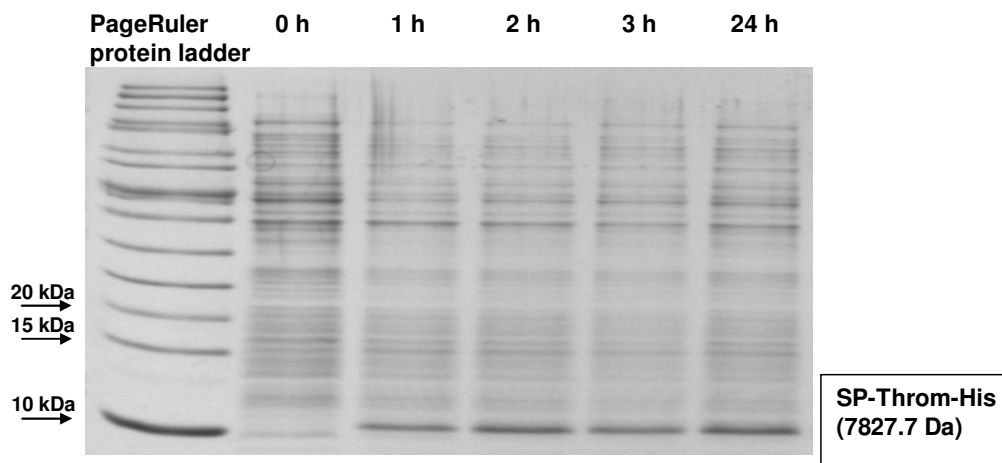


Abbildung 7: SDS-PAGE der Expression des SP-Throm-His in Vollmedium

Das durch Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde anschließend mit ca. 25 mL His-Trap Binding Buffer aufgenommen und mit Proteaseinhibitoren versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall. Danach wurden die Zelltrümmerfraktion und eventuell gebildete inclusion bodies mittels Zentrifugation und die Membranen mittels Ultrazentrifugation abgetrennt. Alle löslichen Proteine waren durch dieses Verfahren im Überstand der Ultrazentrifugation, der die Zellplasma-Fraktion bildete. Zur Solubilisierung der Zelltrümmer-Fraktion (Zelltrümmer, inclusion bodies, unaufgeschlossene Zellen) und der Membran-Fraktion wurde das anionische Detergenz NLS (N-Laurylsarcosin) verwendet. Das Protein war nach vorangegangenem Schritt in unterschiedlicher Menge in den drei Fraktionen zu finden. Der Hauptanteil des Proteins wurde in der Membran- und der Zelltrümmer-Fraktion gefunden, was aufgrund der theoretischen schlechten Löslichkeit in wässriger Lösung zu erwarten war. Zur Charakterisierung des aufgereinigten Signalpeptids wurde ein MALDI-TOF-Spektrum aufgenommen und die erwartete Masse von 6618 Da konnte detektiert werden (siehe Abb. 8). Die Proteinausbeute des ^{15}N , ^{13}C -markierten Signalpeptids betrug 4 mg/L. 10 mg/L Protein konnten aus der Expression in LB-Medium gewonnen werden.

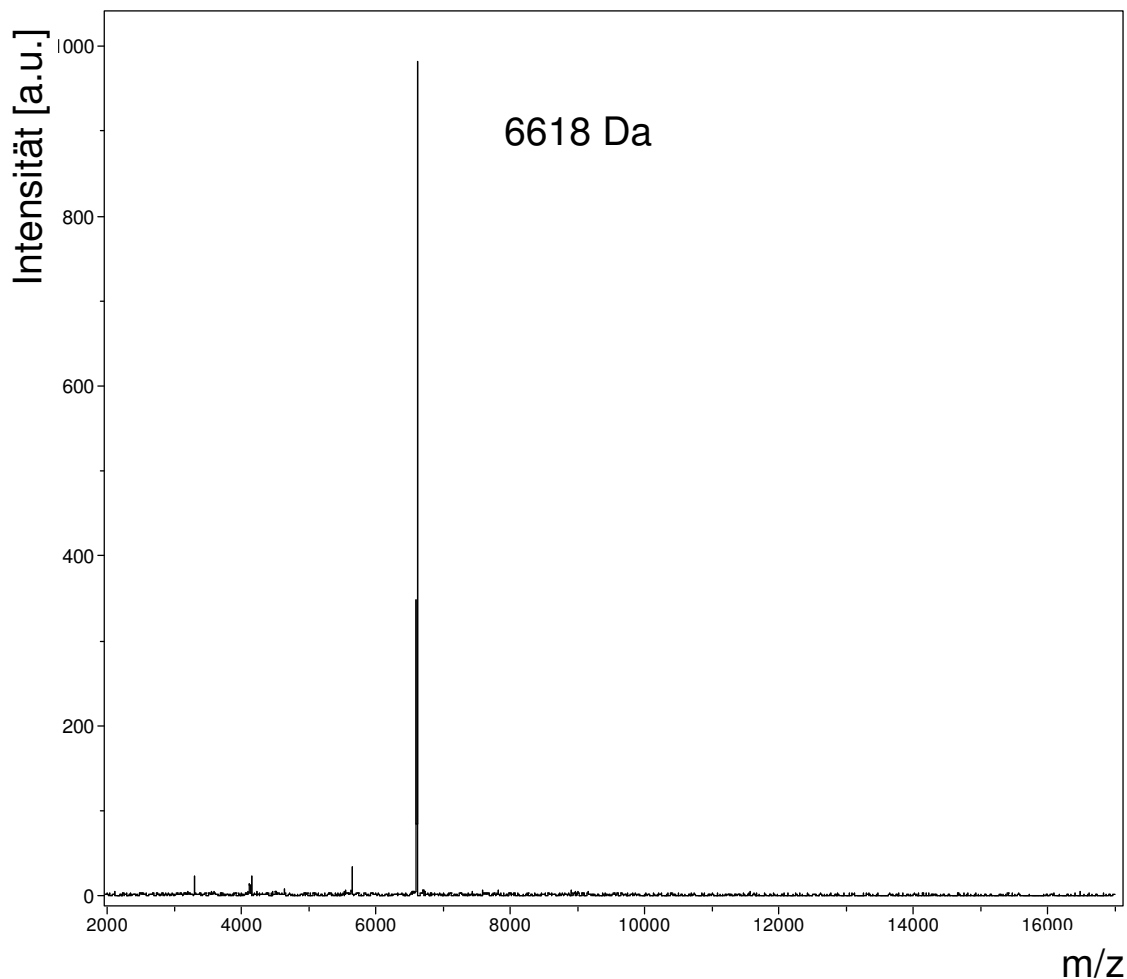


Abbildung 8: MALDI-TOF-Spektrum des aufgereinigten und durch Thrombin vom His-Tag abgespaltenen Signalpeptids.

3.1.2 Zirkulardichroismus (CD) Messungen am Signalpeptid von PhoD

Um eine Vorstellung der Sekundärstruktur des Signalpeptids zu gewinnen, wurden Zirkulardichroismus (CD) Messungen durchgeführt. Nach der Untersuchung des Sekundärstrukturanteils mittels gewöhnlicher CD-Spektroskopie, sollte durch orientierte Zirkulardichroismus-Messungen die Lage dieser Anteile relativ zur Modellmembran bestimmt werden. Dabei ist das CD-Spektrum immer eine Überlagerung aller im Protein vorkommenden Sekundärstrukturelemente und zeigt daher nur eine globale Information.

Das Signalpeptid sollte in einer membranimitierenden Umgebung gemessen werden, da es in der Natur höchstwahrscheinlich mit der Biomembran der Zelle interagiert und einen hydrophoben Bereich besitzt. Deshalb wurden CD-Spektren in SDS-

Mizellen und Lipidvesikeln aufgenommen (siehe Abb. 9). Um gleichzeitig den Einfluss negativ geladener Lipidkopfgruppen auf das Protein zu untersuchen, wurden verschiedene Lipidkompositionen verwendet. Mit dieser Strategie sollte die Hypothese, dass die positiv geladenen Aminosäuren mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Lipide interagieren, geprüft werden. Die charakteristischen Banden bei 195 nm, 208 nm und 225 nm dienen hierbei der Abschätzung des α -helikalen Sekundärstrukturanteils. Sowohl die Proben in Detergenz-Mizellen als auch die Proben in Lipid-Vesikel zeigen ein Maximum bei 195 nm und jeweils ein Minimum bei 208 nm und 225 nm. Das Verhältnis von ca. 1:1 der MRE-Intensitäten bei 195 nm und 208 nm lässt einen geringen bis mittleren α -helikalen Anteil vermuten.

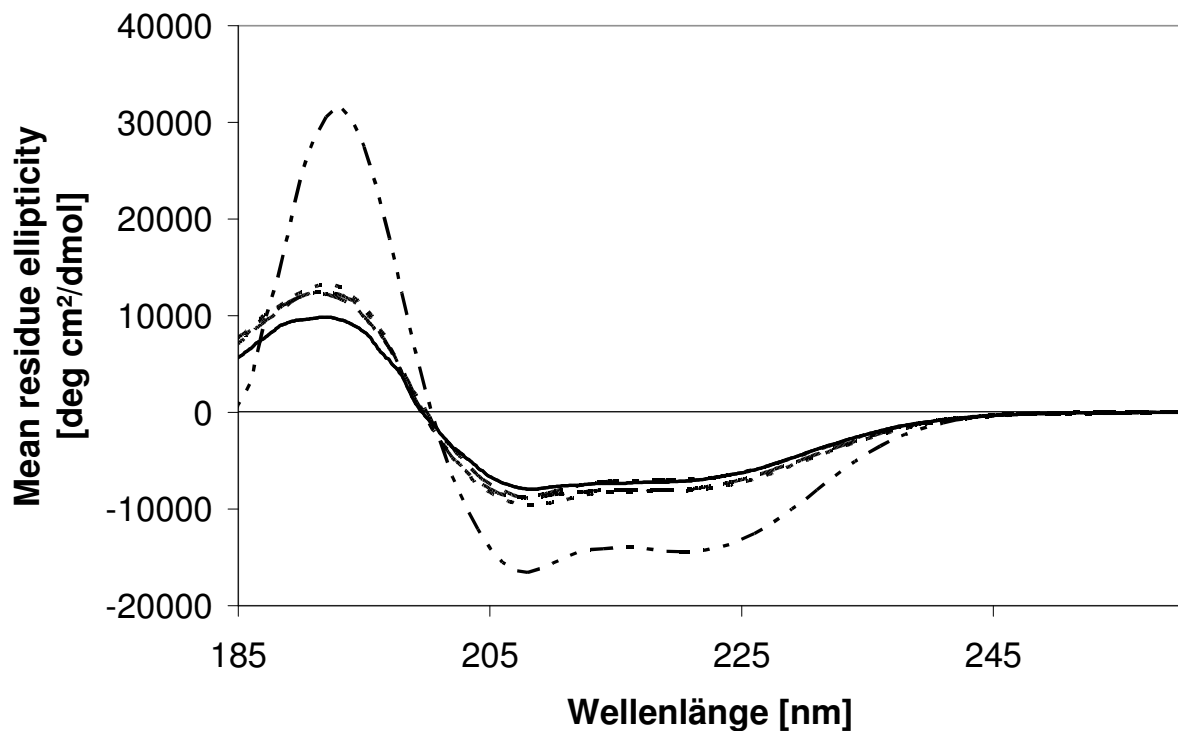


Abbildung 9: CD-Spektren des Signalpeptids in 50% TFE (-----) (Diplomarbeit Thomas Eisele, KIT Karlsruhe), SDS-Mizellen (— SDS) mit einem Protein/Detergenz-Verhältnis von 1:200 (mol/mol) gemessen bei 20°C und in DMPC/DMPG-Vesikeln (----- DMPC, DMPC/DMPG 80/20, ----- DMPC/DMPG 30/70) mit einem Protein/Lipid-Verhältnis von 1:25 (mol/mol) gemessen über dem Phasenübergang der Lipide bei 30°C. Alle Spektren weisen auf eine überwiegende α -helikale Konformation hin.

Neben der qualitativen Auswertung der CD-Spektren aufgrund der spektralen Form können auch quantitative Aussagen durch entsprechende Auswertelgorithmen getroffen werden. Hierzu werden die CD-Spektren des Signalpeptids mit den Basisspektren von Proteinen, die eine reine Sekundärkonformation besitzen, verglichen. Zur quantitativen Auswertung müssen die MRE-Werte, die eine mittlere

molare Elliptizität pro Peptidbindung darstellen, berechnet werden. Diese ermöglichen einen Vergleich von CD-Spektren unterschiedlicher Proteine. Zur Berechnung der MRE-Werte ist allerdings die genaue Kenntnis der Proteinkonzentration nötig.

$$[\theta]_{\text{MRE}} = \frac{\theta}{10 \times c_r \times d} \left[\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1} \right]$$
$$c_r = \frac{n \times c_\theta}{M_w} \left[\text{mol} \times \text{L}^{-1} \right]$$

θ = Elliptizität [mdeg]

M_w = Molekulargewicht des Proteins [g / mol]

n = Anzahl der Peptidbindungen

c_θ = Proteinkonzentration [g / L]

d = Schichtdicke [cm]

Aufgrund des Tryptophans und des Tyrosins in der Aminosäuresequenz des Proteins war eine spektroskopische Proteinbestimmung möglich. Zur quantitativen Sekundärstrukturanalyse wurden die zwei Algorithmen CONTIN-LL^{82,83} (siehe Tab. 1) und CDSSTR⁸⁴ (siehe Tab. 2) verwendet, die von dem Server DICHROWEB^{85,86} bereitgestellt werden. Beide Algorithmen lieferten sehr ähnliche Ergebnisse für alle Proben, und wie aus den Spektren zu deuten war, den höchsten α -helikalen Anteil für das Protein in Lipidvesikel mit einem Verhältnis DMPC/DMPG von 30/70 (mol/mol) von ca. 25 %. Eine α -Helikalität von ca. 50 % wurde für das Signalpeptid in TFE/Phosphat-Puffer (50/50 v/v) ermittelt (Diplomarbeit Thomas Eisele, KIT Karlsruhe). Viele Studien in TFE zeigen jedoch, dass TFE Domänen mit helikalen Tendenzen verstärkt α -Helices ausbilden. Das CD-Spektrum ist ebenfalls in Abbildung 9 zu sehen.

Contin

Lipid(e)/ Detergenz	Helix	β -Faltblatt	β -Schleife	Zufallsknäuel	NRMSD
SDS	0,22	0,24	0,20	0,34	0,068
DMPC	0,20	0,26	0,21	0,33	0,029
DMPC/DMPG (80/20)	0,23	0,24	0,20	0,33	0,033
DMPC/DMPG (30/70)	0,26	0,22	0,20	0,32	0,037

Tabelle 1: Auswertung der CD-Messungen mittels des Algorithmus Contin.^{82,83}

CDSSTR

Lipid(e)/ Detergenz	Helix	β -Faltblatt	β -Schleife	Zufallsknäuel	NRMSD
SDS	0,23	0,25	0,18	0,34	0,013
DMPC	0,20	0,24	0,19	0,37	0,015
DMPC/DMPG (80/20)	0,22	0,23	0,19	0,36	0,01
DMPC/DMPG (30/70)	0,25	0,20	0,18	0,37	0,019

Tabelle 2: Auswertung der CD-Messungen mittels des Algorithmus CDSSTR.⁸⁴

3.1.3 Orientierte CD-Spektroskopie des Signalpeptids von PhoD in Lipiddoppelschichten

Um die Orientierung des helikalen Bereiches des Signalpeptids in Lipidmembranen untersuchen zu können, wurde das Protein in orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituiert. Eine CD-Spektroskopie-Messung dieser Art von orientierter Probe ermöglicht Rückschlüsse, ob die α -Helices senkrecht oder eher parallel zur Membrannormalen verlaufen. Die Information hierfür kann aus der Intensität der charakteristischen Bande bei ca. 208 nm gewonnen werden. Ein Wert null entspricht einer senkrechten transmembranen Orientierung. Als Modellmembranen wurden wieder die gleichen Lipidmischungen, die schon in den CD-Messungen benutzt wurden, verwendet. Für die OCD-Messungen wurde ein Protein/Lipid-Verhältnis von 1:100 gewählt.

Abbildung 10 zeigt die OCD-Spektren des Signalpeptids in den makroskopisch orientierten Lipidmembranen mit unterschiedlichen Lipidkompositionen. Da die Kurven einen identischen Verlauf besitzen, konnte kein zusätzlicher Einfluss durch die negativ geladenen DMPG-Lipide detektiert werden. Alle Messungen weisen eher auf eine parallele zur Membranoberfläche bzw. einer leicht dazu geneigten und nicht transmembranen Orientierung hin, da in jedem Spektrum bei 208 nm eine von null verschiedene bzw. negative Bande zu erkennen ist. Die gefundene Orientierung des Signalpeptids zur polaren/unpolaren Grenzfläche ist charakteristisch für eine amphiphile α -Helix und somit gegensätzlich zur Idee einer transmembranen hydrophoben Helix, die in den meisten früheren Studien über das Signalpeptid angenommen wurden.

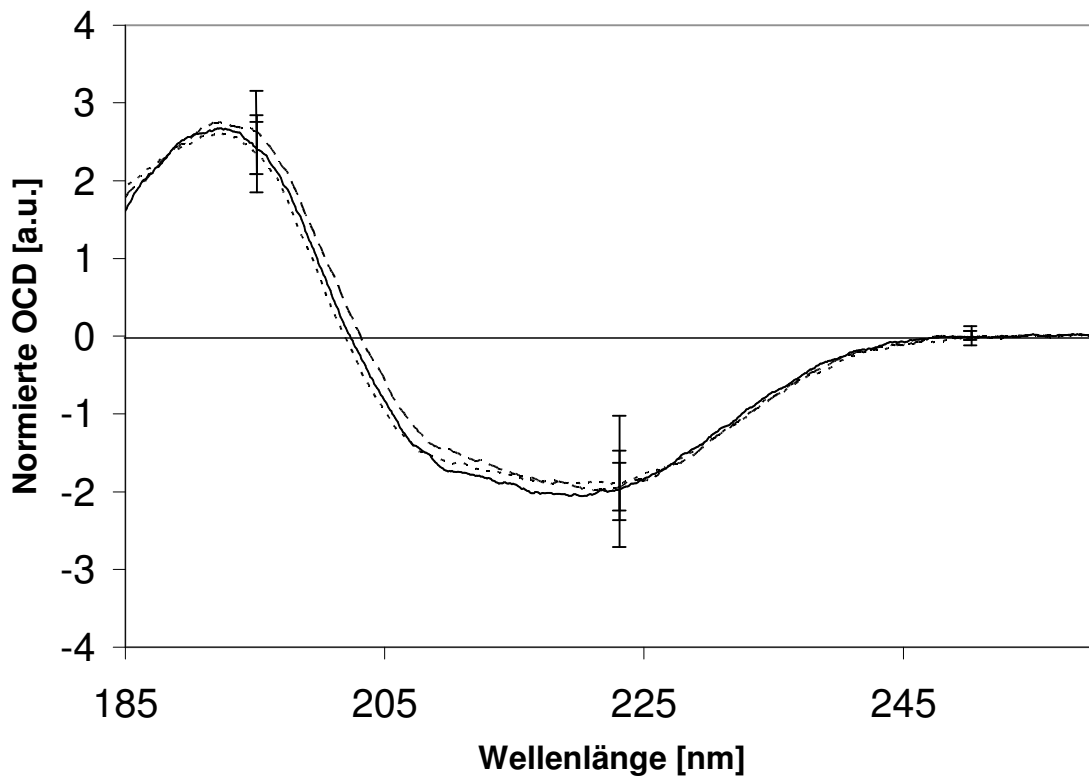


Abbildung 10: CD-Spektren des Signalpeptids in orientierten Lipiddoppelschichten mit verschiedenen DMPC/DMPG-Verhältnissen (— DMPC, ----- DMPC/DMPG 80/20, DMPC/DMPG 30/70), aufgenommen bei 30°C und einer relativen Luftfeuchte von 97%. Die Spektren wurden auf die gleiche Intensität bei 225 nm normiert, um die Gleichheit des Kurvenverlaufs darzustellen. Alle Spektren zeigen eine überwiegend parallele Anordnung der helikalen Bereiche zur Membranoberfläche.

3.1.4 Vorhersage der Sekundärstruktur des SP mittels verschiedener Softwareprogramme

Nachdem der α -helikale Sekundärstrukturanteil und dessen Orientierung zur Membranoberfläche berechnet und analysiert wurden, sollte durch verschiedene Sekundärstruktur-Vorhersageprogramme eine Idee von der ungefähren Position der Helix gewonnen werden. Hierzu wurden die Software-Programme Jpred3⁸⁷, ProtScale (Levitt)⁸⁸, Protscale (Deleage&Roux)⁸⁸, NetSurfP⁸⁹ verwendet.

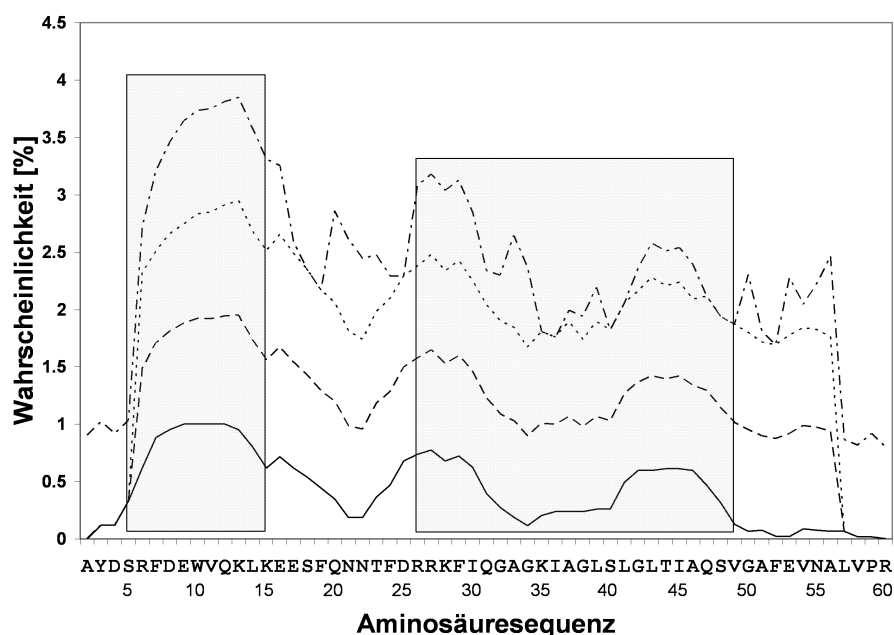


Abbildung 11: Vorhergesagte Positionen einer α -helikalen Sekundärstruktur in der Aminosäuresequenz des Signalpeptids (----- Jpred3, Levitt, -.-.-.- Deleage&Roux, — NetSurfP). Eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Helix zeigt sich im N-terminalen Bereich (~S5-K15) und eine etwas geringere im hydrophoben Bereich des Signalpeptids (~ R26-V49).

Alle Programme weisen die höchste Wahrscheinlichkeit für eine α -Helix in etwa dem Bereich S5-K15 auf, der auch durch die späteren NMR-Ergebnisse als helikal bestätigt werden konnte (siehe Abb. 11). Die Länge von ca. 11 Aminosäuren entspricht weiterhin in etwa dem α -helikalen Sekundärstrukturanteil (20-25 %), der bei den CD-Messungen ermittelt wurde. Jedoch wird ein zweiter Abschnitt mit einer etwas geringeren Wahrscheinlichkeit für eine α -helikale Formation im hydrophoben Bereich (~R26-V49) des Signalpeptids vorhergesagt. Diese vorhergesagte Helix

scheint aber im Bereich G38 unterbrochen zu sein. Eine α -Helizität von 50 % wurde für das Signalpeptid in einer CD-Messung in TFE/Phosphat-Puffer (50/50 v/v) ermittelt (siehe CD-Spektroskopie) (Diplomarbeit Thomas Eisele, KIT Karlsruhe). TFE zeigte bei diesen CD-Messungen seine Eigenschaft, auch Abschnitte mit einer kleinen Wahrscheinlichkeit für eine α -Helix helikal zu vermessen. Beide Bereiche der Vorhersage zusammen entsprechen in etwa diesen 50 % an α -helikalem Sekundärstrukturanteil.

3.1.5 Berechnung des hydrophoben Moments des SP

Da aufgrund der Vorhersageprogramme zwei potentielle helikale Bereiche in der Aminosäuresequenz des Signalpeptids (ca. 50 %) vorhanden sein könnten, der durch die CD-Spektroskopie ermittelte helikale Anteil in Membranumgebung aber nur 20-25 % beträgt, sollte die genaue Position durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Hierbei stellte sich die Frage, ob eher eine hydrophobe α -Helix in der h-Domäne, wie allgemein in der Literatur vermutet, oder eine amphiphile Helix, die aufgrund der OCD-Spektroskopiemessungen wahrscheinlicher ist, vorliegt. Um potentielle amphiphile Helices mit einer Länge von ca. 11 Aminosäuren ausfindig zu machen, wurde für die gesamte Aminosäuresequenz das hydrophobe Moment jeweils für eine Länge von 11 aufeinander folgenden Aminosäuren mit Hilfe des Programms HeliQuest⁹⁰ berechnet (siehe Abb. 12). Das größte hydrophobe Moment und somit die potentiell amphiphilste α -Helix wurde im Bereich der Aminosäuren S5-K15 gefunden. Eine Analyse weiterer Tat-Signalsequenzen von *E.coli* und *B.subtilis* bezüglich ihrer Hydrophobizität und des Hydrophoben Moments über eine Länge von 11 Aminosäuren findet sich Anhang. Jedoch konnte für diese Signalpeptide keine potentielle amphiphile Helix gefunden werden.

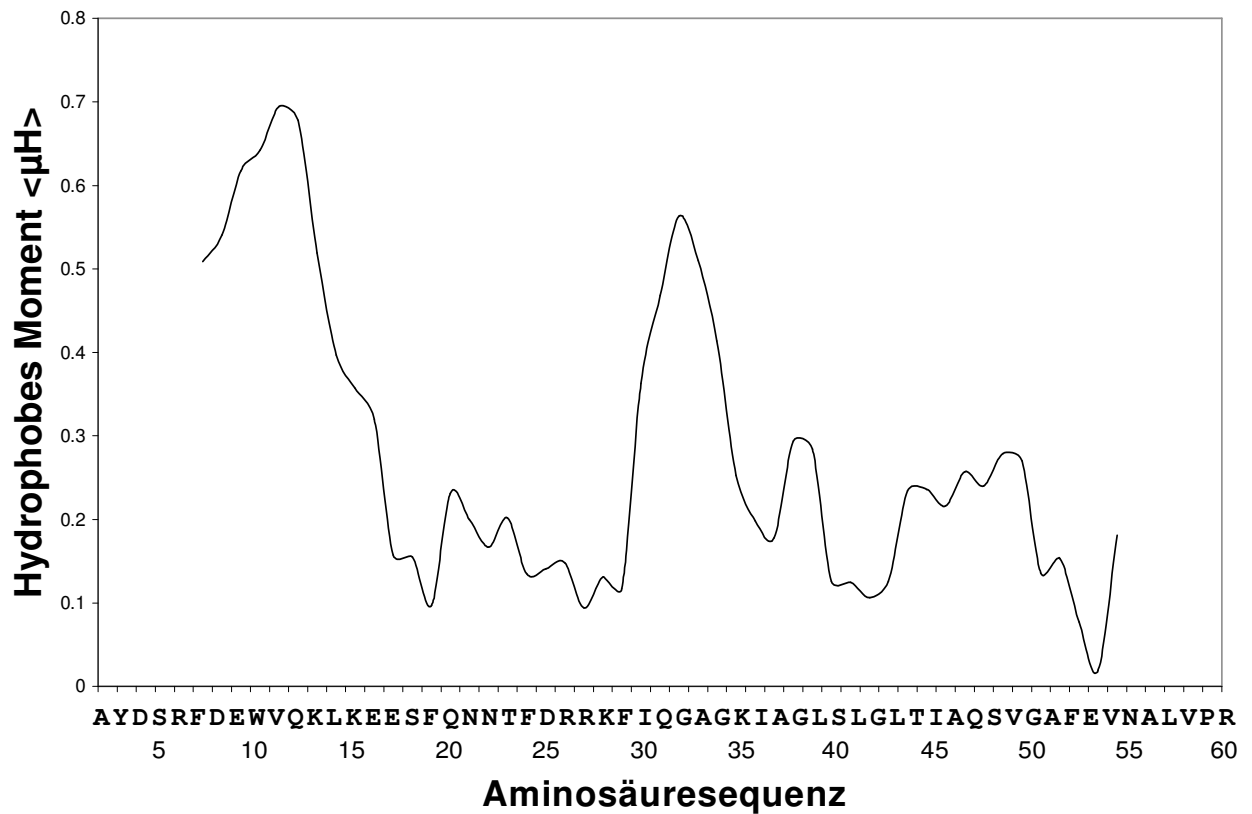


Abbildung 12: Mit HeliQuest⁹⁰ berechnetes hydrophobes Moment für jeweils 11 aufeinander folgende Aminosäuren um die angegebene Position. Der höchste Wert wurde für den Bereich S5-K15 in der N-terminalen Region des Signalpeptids gefunden.

Dieser Bereich entspricht exakt der am wahrscheinlichsten vorhergesagten und später durch die NMR-Experimente bestätigten Helix. Als Helical Wheel Plot veranschaulicht zeigt dieser Bereich einen eindeutigen amphiphilen Charakter. Wie in Abbildung 13(A) dargestellt liegen alle hydrophoben (gelb) auf der gegenüberliegenden Seite der polaren Aminosäurereste (rot und blau). Der schwarze Pfeil veranschaulicht die Richtung des hydrophoben Moments. Ebenso ist die Amphipathizität der Helix durch eine 2D-Projektion der aufgeschnittenen Helix in Abbildung 13(B) veranschaulicht.

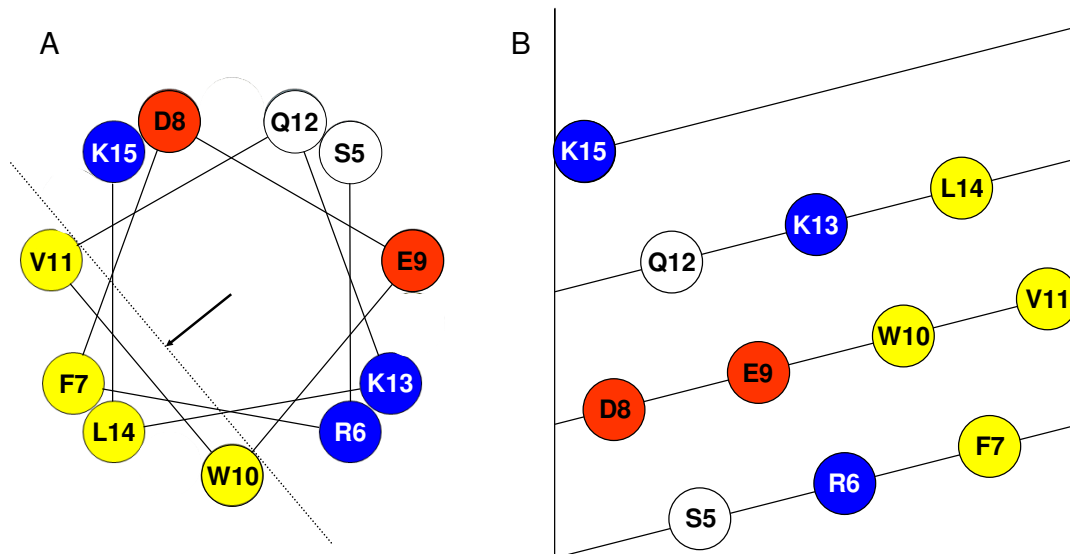


Abbildung 13: (A) Helical Wheel Plot des N-terminalen Bereiches S5-K15. Dieser Bereich besitzt das größte hydrophobe Moment und zeigt den amphiphilen Charakter mit allen hydrophoben Aminosäureresten (gelb) auf der einen Seite der Helix und die geladenen Aminosäurereste (rot und blau) auf der anderen Seite der vermuteten Helix. Der Pfeil veranschaulicht die Richtung des hydrophoben Moments. (B) 2D-Projektion der aufgeschnittenen Helix im Bereich S5-K15 des Signalpeptids. Die beiden Grafiken wurden mit Hilfe des Programms PROTEIN-ORIGAMI (AK Ulrich, KIT Karlsruhe) erstellt.

3.1.6 Flüssigkeits-NMR Spektroskopie am Signalpeptid von PhoD

Aufgrund der vorausgegangenen Messungen und Berechnungen sollte nun durch genauere Messmethoden die Idee einer amphiphilen α -Helix im N-terminalen Bereich des Signalpeptids (S5-K15) geprüft werden. Hierfür wurden unterschiedliche Flüssigkeits-NMR-Experimente an uniform ^{13}C , ^{15}N - markiertem Signalpeptid in SDS-Mizellen aufgenommen.

3.1.6.1 ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektroskopie

Das erste Flüssigkeits-NMR-Experiment, das zur genaueren Strukturaufklärung aufgesetzt wurde, war eine ^1H , ^{15}N -HSQC-Messung. Dieses Experiment ist ein Basisbaustein in Experimenten für die Zuordnung der verschiedenen Aminosäurereste und zeigt im prozessierten Spektrum einen *fingerprint* des Proteins. Durch diesen *fingerprint* kann auch die Qualität der Probe aus der Auflösung und der Grad der Faltung aufgrund der Dispersion des Spektrums abgeschätzt werden. Die relativ geringe Dispersion, die das Spektrum des Signalpeptids in Abbildung 14 zeigt, kann auf zwei Arten interpretiert werden. Die eine Möglichkeit ist eine geringe Diversität an Sekundärstrukturmotiven, die andere ein geringer Faltungsanteil des

Proteins. Aufgrund der Ergebnisse der CD-Spektroskopie ergibt sich die geringe Dispersion höchst wahrscheinlich aus dem geringen Faltungsanteil des Proteins. Trotz der geringen Dispersion waren die einzelnen Signale jedoch hoch aufgelöst und mit einer Anzahl von 58 Signalen im Bereich der Amid-Rückgrat Protonen entsprachen die HN-Kreuzsignale exakt der Erwartung. Das Signalpeptid besteht nämlich aus 59 Aminosäuren, wobei berücksichtigt werden muss, dass das Prolin aufgrund des fehlenden Amidprotons kein Signal ergibt. Die HN-Protonen der Seitenketten wurden in dieser Arbeit vernachlässigt, da sie zur Sekundärstrukturaufklärung durch weitere Experimente nicht benötigt wurden. Um die Signale des HSQC-Spektrums den einzelnen Aminosäuren zuordnen zu können, waren weitere Experimente nötig. Zur Zuordnung wurden Informationen über die sequentielle Konnektivität benötigt, die aus hochauflösenden $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -NMR Tripelresonanzexperimenten, sogenannten „Rückgrat“-Experimenten, gewonnen werden können.

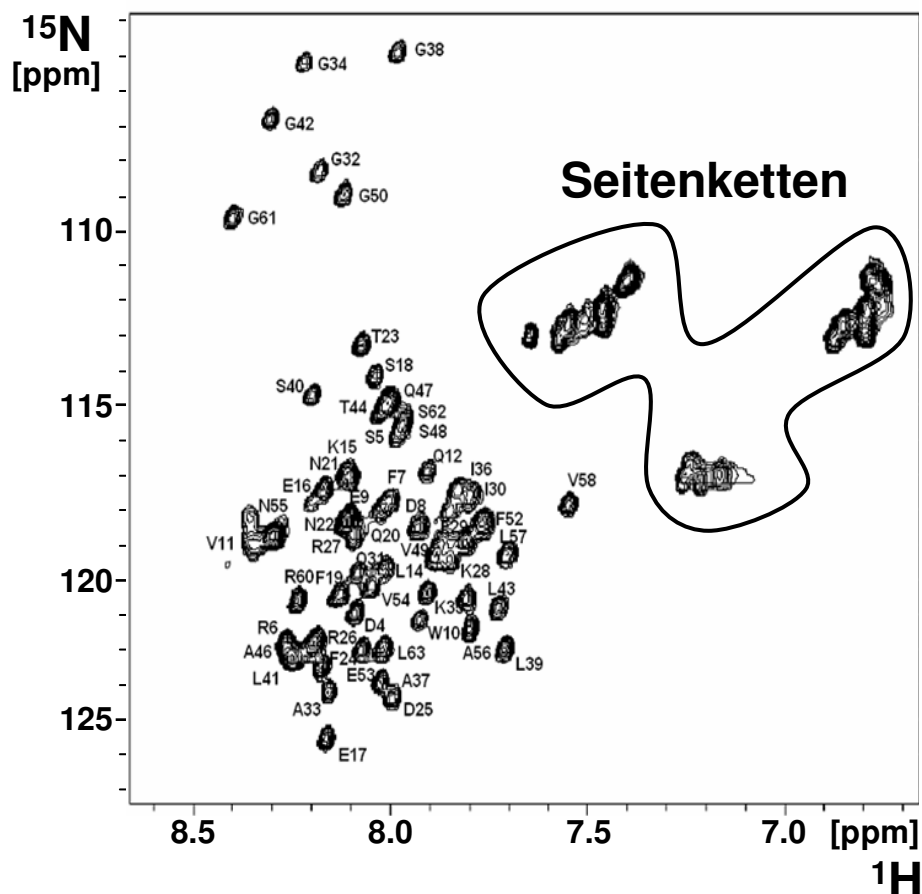


Abbildung 14: ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum des Signalpeptids gemessen bei 35°C und mit Hilfe von Tripelresonanzexperimenten zugeordnet. Die hohe Diversität der Aminosäuresequenz ermöglichte trotz der geringen Dispersion eine eindeutige Zuordnung. Die geringe Dispersion kann aufgrund weniger verschiedener Sekundärstrukturmodule im Protein oder eines geringen Faltungsgrades auftreten.

3.1.6.2 Sekundärstruktur des Signalpeptids aus ^{13}C -chemischen

Verschiebungen

Zur genauen Bestimmung von lokalen Sekundärstrukturmotiven können die charakteristischen ^{13}C -chemischen Verschiebungen genutzt werden, insbesondere von $\text{C}\alpha$ und $\text{C}\beta$. Hierzu ist die Zuordnung der ^{13}C -NMR Signale zu den jeweiligen Aminosäuren im Protein notwendig, die aus den dreidimensionalen Tripelresonanzexperimenten, wie HNCA, CBCANH, CBCA(CO)NH, gewonnen wurde. Zur erleichterten Auswertung wurden die dreidimensionalen Spektren in zweidimensionale Streifen eingeteilt, die sich jeweils in der dritten Dimension unter den HN-Kreuzsignalen des zweidimensionalen ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrums befanden.

Die Zuordnung der Aminosäuren erfolgt hierbei in zwei Schritten. Zum einen besitzt jeder Aminosäuretyp ein spezifisches Signalmuster aus zwei bis vier auftretenden Resonanzsignalen und zum anderen kann die Position des entsprechenden Aminosäurerests über die Resonanzsignale der Nachbarschaften ermittelt werden. Anhand des Vergleichs der CBCANH- und der CBCA(CO)NH-Spektren, welche das $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Resonanzsignal der eigenen als auch der vorangegangenen Aminosäure zeigen, können die Aminosäuren sequentiell zugeordnet werden. Um $\text{C}\alpha$ und $\text{C}\beta$ unterscheiden zu können, wurden die zweidimensionalen Streifen der CBCANH-Spektren mit denen der HNCA-Spektren, die nur die Kreuzsignale $\text{C}\alpha$ -Atome zeigen, verglichen. Da die CBCA(CO)NH-Spektren nur die $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Resonanzsignale der vorangehenden Aminosäure zeigen, kann mit Hilfe dieser und der CBCANH-Spektren eine Unterscheidung zwischen den Kreuzsignalen der Aminosäure i und ihres Vorgängerrestes $i-1$ getroffen werden. Abschließend können aus den zugeordneten ^{13}C -Signalen auch die Amid ^1H - und ^{15}N -Signale zugeordnet werden (^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum siehe Abb. 14). Durch die starke Abhängigkeit der $\text{C}\alpha$ und $\text{C}\beta$ chemischen Verschiebung des jeweiligen Aminosäurerestes von der Sekundärstruktur, in der sich dieser befindet, kann auf α -helikale Bereiche zurückgeschlossen werden. Um ein Sekundärstrukturmotiv zu detektieren, wird die Differenz der gemessenen $\text{C}\alpha$ und $\text{C}\beta$ chemischen Verschiebung mit dem Wert der Differenz der random-coil $\text{C}\alpha$ und $\text{C}\beta$ chemischen Verschiebung der jeweiligen Aminosäure verglichen. Die random-coil Daten wurden aus der BMRB-Datenbank entnommen. Im Fall von mindestens drei Aminosäureresten in Folge, in der die $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ Differenz der gemessenen Werte um 2 ppm größer ist als die jeweilige Differenz der random coil Werte, deutet dies auf einen α -helikaler Bereich hin. Im

Säulendiagramm in Abbildung 15 treten zum einen verstärkt positive Werte, die auf eine α -helikale Sekundärstruktur hindeuten, im Bereich zwischen S5-K15 auf. Dies ist exakt der Bereich in dem aufgrund der vorausgegangenen Messungen eine amphiphile α -Helix erwartet wurde. Zum anderen zeigen sich, wie schon bei der Vorhersage beobachtet, helikale Tendenzen im hydrophoben Bereich (\sim R26-V49) des Signalpeptids. Diese positiven Differenzen sind jedoch nicht so eindeutig und es ist eine Unterbrechung um G38, die auch schon bei der Vorhersage der helikalen Bereiche des Signalpeptids erkannt wurde, zu erkennen.

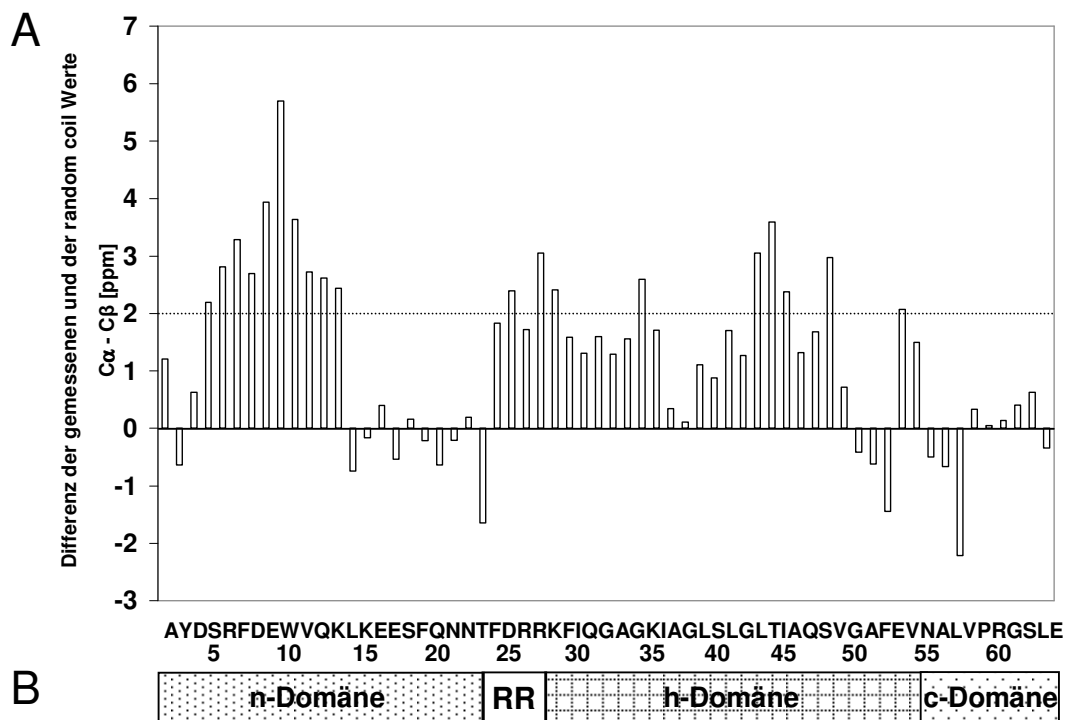


Abbildung 15: (A) Differenzen zwischen den gemessenen und den mittleren random-coil ($C\alpha$ - $C\beta$)-Werten. Eine positive Differenz von mehr als zwei ppm für mindestens drei Aminosäurereste in Folge deutet auf eine α -Helix hin. Eine Region für eine α -helikale Sekundärstruktur findet sich im Bereich S5-K15 und eine zweite weniger eindeutige im hydrophoben Bereich R26-V49. (B) Allgemeine Struktur Tat-abhängiger Signalpeptide.

Die gefundenen α -helikalen Regionen wurden des Weiteren mit den Ergebnissen einer TALOS Analyse⁹¹ der gemessenen ^{13}C -chemischen Verschiebungen verglichen. Das Programm TALOS verwendet die empirisch ermittelte Beziehung zwischen den ^{13}C , ^1H und ^{15}N -chemischen Verschiebungen und den Torsionswinkel φ und Ψ des Rückgrats eines Proteins, um aus diesen wiederum eine Aussage über die Sekundärstruktur des jeweiligen Proteins treffen zu können. Die Auswertung der

TALOS-Analyse des Signalpeptids führte zu einem übereinstimmenden Ergebnis der α -helikalen Bereiche.

3.1.6.3 Strukturinformation aus ^1H - ^1H -Kontakten

Mittels eines ^{15}N -editiertes NOESY-Spektrums sollte die Konnektivität der einzelnen Aminosäuren innerhalb der Sequenz des Proteins ermittelt werden. Eine α -helikale Sekundärstruktur kann bei diesem Experiment durch charakteristische Kontakte zwischen den Amidgruppen (H_N - H_N -Kontakte) benachbarter Aminosäuren detektiert werden. Auch bei dieser dreidimensionalen Messung wurden zweidimensionale Streifen zur Auswertung verwendet. Kreuzsignale bei der gleichen ^1H chemischen Verschiebung in Streifen unterschiedlicher Signale des ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrums zeigen hierbei den Kontakt zweier Amidgruppen und somit eine räumliche Nähe der entsprechenden Aminosäuren. Zur genauen Zuordnung wird hierfür ein ^{15}N -editiertes NOESY-Spektrum benötigt. Jeweils diese zwei Paare von Diagonal- und Kreuzsignalen zu finden, war jedoch selten möglich, da die Auswertung der Spektren durch starke Signalüberlagerungen nicht immer eindeutig war. Daher konnten nur teilweise die für eine α -Helix charakteristischen $\text{H}_{\text{Ni}} - \text{H}_{\text{Ni}+4}$ NOEs im Spektrum des Signalpeptids beobachtet werden. Da charakteristische NOE-Kontakte zwischen den Amidprotonen, falls diese nicht durch die Mizelle geschützt sind, und dem in der wässrigen Probe vorhandenen H_2O auftreten können, wurde versucht auch diese Kreuzsignale zu detektieren. Mit Hilfe dieser Untersuchung sollte ebenfalls eine zusätzliche Bestätigung der α -helikale Bereiche gefunden werden, da die Amidprotonen eingebetteter Helices diese Kontakte nicht aufweisen sollten. Im Falle des Signalpeptids wurden verminderte Wasserkontakte, was keinem Signal bei einer ^1H chemischen Verschiebung von ca. 4,7 ppm entspricht, in den beiden vorhergesagten α -helikalen Bereichen größtenteils gefunden (S5-K15 and R26-V49). Das Ergebnis der Untersuchung der NOEs konnte zwar nicht eindeutig die zuvor gefundenen α -helikalen Bereiche exakt bestätigen, aber bekräftigt zusätzlich tendenziell ihr Vorhandensein.

3.2 Untersuchung des Einflusses von TatA_d auf die Lipiddoppelschicht

Um eine weitere Idee des Mechanismus bzw. der Funktionsweise des Tat-abhängigen Transports in *B. subtilis* zu erlangen, wurden zusätzlich zum Signalpeptid die porenbildende Membrankomponente TatA_d untersucht. Es wurden hierfür wiederum Kernspinresonanzspektroskopie-Methoden verwendet. Bei der Untersuchung von TatA_d wurden jedoch Festkörper-NMR-Experimente als Untersuchungsmethode gewählt, da ein Einblick in die Dynamik und die Wechselwirkung mit den Lipidkopfgruppen, stellvertretend für die Biomembran, gewonnen werden sollte. Aufgrund der Art der Messungen wurden Kopfgruppen-deuterierte Lipide zusammen mit verschiedenen TatA_d-Fragmenten verwendet. Die Proteine wurden hierbei in DMPC-d₄ multilamellaren Vesikel rekonstituiert. Zur Überprüfung der Probenqualität wurden ³¹P-NMR-Experimente herangezogen (siehe 8.5.7).

3.2.1 Die verschiedenen TatA_d-Fragmente

Zum besseren Verständnis, welcher Bereich des TatA_d Proteins an der Interaktion mit der Modellmembran beteiligt ist, wurden verschiedene verkürzte Fragmente für die NMR-Messungen verwendet. In Abbildung 16 sind die verwendeten Fragmente aufgelistet und die entsprechenden Bereiche der Aminosäuren angegeben.

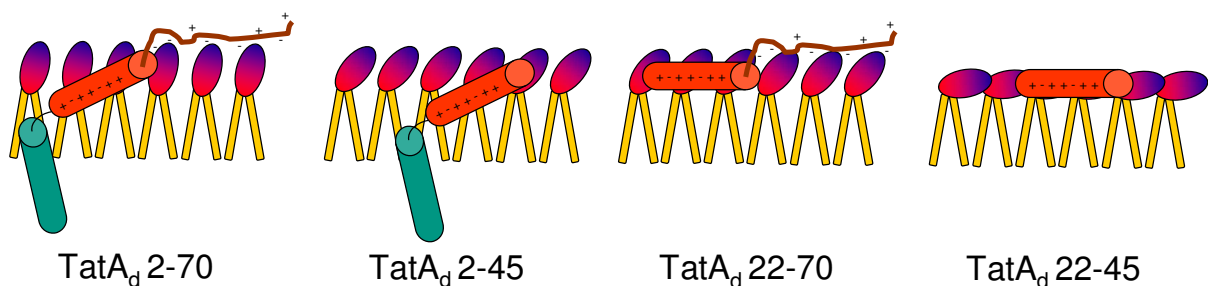


Abbildung 16: Sekundärstruktur von TatA_d und die der verschiedenen verwendeten Konstrukte von TatA_d.

Abgesehen vom vollständigen Konstrukt des TatA_d Proteins (TatA_d 2-70) wurde ein um den unstrukturierten C-Terminus (TatA_d 2-45), ein um die hydrophobe

transmembrane Helix (TatA_d 22-70) und ein um beide Bereiche (TatA_d 22-45) verkürztes Protein verwendet (siehe Abb. 16).

3.2.2 T₁- und T₂- ²H-NMR-Relaxationsmessungen an Lipidkopfgruppen mit verschiedenen TatA_d-Fragmenten

Um den Einfluss der verschiedenen TatA_d-Fragmente auf die Molekülbewegung der Lipidkopfgruppen und auch die Interaktion von Protein und Lipid abschätzen zu können, wurden die longitudinalen (T₁) und die transversalen (T₂) ²H-NMR Relaxationszeiten der Lipidkopfgruppen gemessen. Durch eine Fourier-Transformation der Korrelationsfunktion, einer Funktion der Zeit, kann die Spektrale Dichtfunktion, eine Funktion der Frequenzen, gewonnen werden. Anhand des T₁- und T₂-Wertes im Vergleich zu den Werten einer Kontrolle kann die Zeitskala von Molekülbewegungen abgeschätzt werden. Um eine Relaxationszeit messen zu können, muss eine starke, jedoch nicht zu starke, Relaxation in dieser Zeitskala vorhanden sein. Mit T₁, der longitudinalen bzw. Spin-Gitter-Relaxation, sind Bewegungen auf der schnellen Zeitskala um die Larmor-Frequenz detektierbar. Mit T₂, der transversalen bzw. Spin-Spin-Relaxation, sind Molekülbewegungen auf der langsamen Zeitskala beobachtbar, d.h. Frequenzen die viel kleiner sind als die Larmor-Frequenz. Nimmt also eine Relaxationszeit zu, bedeutet das eine verminderte Relaxation, also eine verminderte Beweglichkeit im Bereich der entsprechenden Zeitskala.

3.2.2.1 Einfluss des Protein/Lipid-Verhältnisses auf T₁ und T₂

Um den Einflussbereich der Menge des Proteins auf die Lipidkopfgruppen abschätzen zu können, wurden als erstes Relaxationsmessungen des vollständigen TatA_d-Proteins bei verschiedenen Protein/Lipid-Verhältnissen durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine Probe, die gänzlich aus DMPC-d₄ Lipiden ohne Protein bestand, verwendet. Es wurden die Protein/Lipid-Verhältnisse 1:200, 1:100 und 1:50 gewählt. Tabelle 3 zeigt den Einfluss des Proteins auf die Relaxationszeiten der Lipide.

	Kontrolle	TatA _d 2-70 P/L 1:200	TatA _d 2-70 P/L 1:100	TatA _d 2-70 P/L 1:50
T ₁	24,86 ± 0,69 ms	24,86 ± 0,87 ms	24,53 ± 0,50 ms	26,79 ± 0,75 ms
T ₂	2,42 ± 0,14 ms	2,18 ± 0,16 ms	2,78 ± 0,28 ms	5,14 ± 0,38 ms

Tabelle 3: Gemessene T₁- und T₂-Relaxationszeiten von DMPC-d4 bei verschiedenen Protein/Lipid-Verhältnissen.

Es konnte gezeigt werden, dass im Bereich der schnellen Molekülbewegungen kein Einfluss durch das Protein zu erkennen war. Die T₁-Werte unterscheiden sich nur geringfügig von denen der Kontrolle. Die T₂-Messungen spiegeln im Fall des Protein/Lipid-Verhältnisses 1:100 und 1:200 das gleiche Ergebnis wider. Jedoch bei einem Protein/Lipid-Verhältnis von 1:50 wurde ein ca. doppelt so hoher Wert für die transversale Relaxation ermittelt. Dies lässt sich als eine Reduktion der Molekülbewegungen auf der langsamen Zeitskala interpretieren. Wie es scheint nimmt das TatA_d-Protein Einfluss auf die Lipiddoppelschicht. Da der Effekt aber erst ab einem Protein/Lipid-Verhältnis von 1:50 detektierbar war, wurde dieses Verhältnis für die anderen Fragmente und weiteren Experimente von nun an verwendet.

3.2.2.2 Einfluss der verschiedenen Fragmente auf T₁ und T₂

Da die ²H-NMR-Messung des TatA_d 2-70 erst einen Einfluss bei einem Protein/Lipid-Verhältnis 1:50 zeigte, wurden alle Proben mit diesem Verhältnis hergestellt und untersucht. Die Messungen der verschiedenen Fragmente der porenbildenden Komponente des Tat-abhängigen Transports ergaben, wie in Tabelle 4 zu sehen ist, dass auch hier kein Einfluss durch die Proteine auf die schnellen Bewegungen (T₁-Wert) der Lipidkopfgruppen zu detektieren war.

	Kontrolle	TatA _d 2-45 P/L 1:50	TatA _d 2-70 P/L 1:50	TatA _d 22-70 P/L 1:50	TatA _d 22-45 P/L 1:50
T ₁	24,86 ± 0,69 ms	25,21 ± 0,89 ms	26,79 ± 0,75 ms	25,25 ± 0,79 ms	24,75 ± 0,41 ms
T ₂	2,42 ± 0,14 ms	3,16 ± 0,10 ms	5,14 ± 0,38 ms	5,68 ± 0,56 ms	2,80 ± 0,16 ms

Tabelle 4: Gemessene T₁- und T₂-Relaxationszeiten von DMPC-d₄ mit den verschiedenen TatA_d-Fragmenten.

Die Messungen der transversalen Relaxationszeiten zeigen in zwei Fällen einen Einfluss des jeweiligen Proteins. Dass bei TatA_d 2-70 ein ca. doppelter Wert gefunden wurde, ist bereits aufgrund 3.2.2.1 bekannt, aber auch das Fragment TatA_d 22-70 zeigt einen erhöhten Wert für die Spin-Spin-Relaxation. Bei beiden Proteinen ist von einem Einfluss, welcher die Molekülbewegungen der Lipide auf der Zeitskala der langsamen Bewegungen reduziert, auszugehen. Gemein ist beiden Proteinen, im Vergleich mit den übrigen Fragmenten, der negativ geladene C-Terminus. Da der C-Terminus aufgrund der Relaxationsexperimente einen Einfluss auf die Kopfgruppe zu besitzen scheint, wurden weitere ²H-NMR-Experimente aufgesetzt, mit Hilfe derer genauere Aussagen über die Neigung und somit Interaktion der Proteine mit der Kopfgruppen getroffen werden konnten.

3.2.3 Untersuchung der Quadrupol-Aufspaltung der Lipidkopfgruppen mit verschiedenen TatA_d-Fragmenten

Abgesehen von den Relaxationszeiten können durch ²H-NMR-Experimente weitere Informationen aus den auftretenden Quadrupolaufspaltungen erhalten werden. Für jede CD₂-Gruppe ergibt sich als Spektrenform bei diesen Messungen ein sogenanntes Pake-Dublett. Ein Dublett tritt hierbei aufgrund des Deuteriumkerns auf, da dieser einen Spin von eins besitzt. Da die Kopfgruppe bei diesen Messungen alle Orientierungen zum äußeren Magnetfeld B₀ einnehmen kann, ist die grundlegende Form ein sogenanntes Pulverspektrum. Ein Pake-Dublett ist schließlich die

Überlagerung zweier Pulverspektren, die durch eine einzelne CD₂-Gruppe erzeugt werden (siehe Abb. 17).

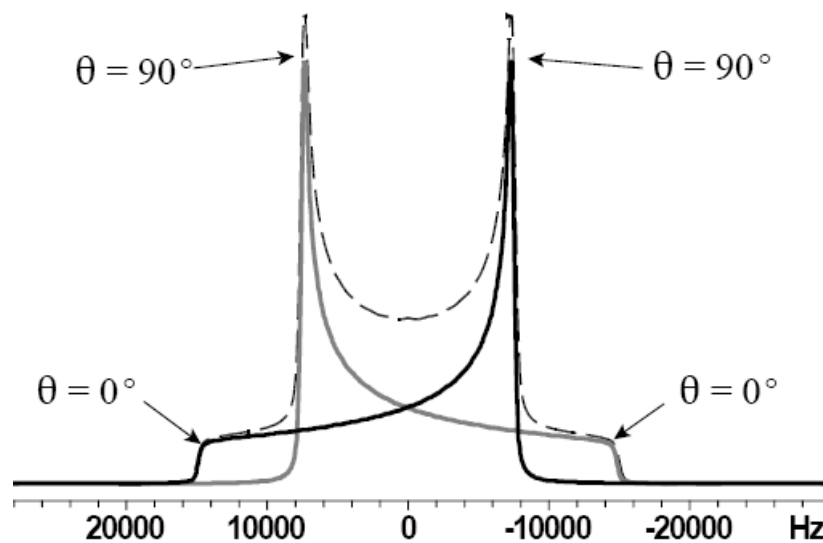


Abbildung 17: Peak-Dublett, die Überlagerung zweier Pulverspektren.
(Bildquelle: http://mutuslab.cs.uwindsor.ca/schurko/ssnmr/ssnmr_schurko.pdf)

Der Bereich zwischen den beiden 90°-Orientierungen wird als Quadrupolaufspaltung bezeichnet und wird durch eine Quadrupolwechselwirkung der beiden Spins der CD₂-Gruppe erzeugt. Im Fall von DMPC-d₄ kann zwischen den beiden Positionen der CD₂-Gruppen unterschieden werden, da diese eine unterschiedliche chemische Umgebung besitzen. Abbildung 18 zeigt das Kopfgruppen-deuterierte Lipid DMPC-d₄ mit der entsprechenden Definition der beiden Gruppen.

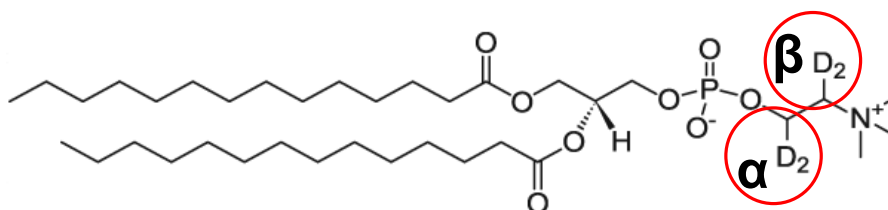


Abbildung 18: DMPC-d₄ mit Markierung der α- und β-Position der CD₂-Gruppen.

In einem ²H-NMR-Spektrum kann daher zwischen der äußeren (α-splitting) und der inneren (β-splitting) Aufspaltung unterschieden werden (siehe Abb. 19). Aus der Literatur ist bekannt, dass bei Kontakt eines von oben auf die Membran bindenden, anionischen Proteins auf die Lipidkopfgruppen eine Zunahme der α-Aufspaltung bei

gleichzeitiger Abnahme der β -Aufspaltung zu beobachten ist. Im Falle eines entsprechend kationischen Proteins zeigt sich exakt das gegenteilige Verhalten.⁹²⁻⁹⁴

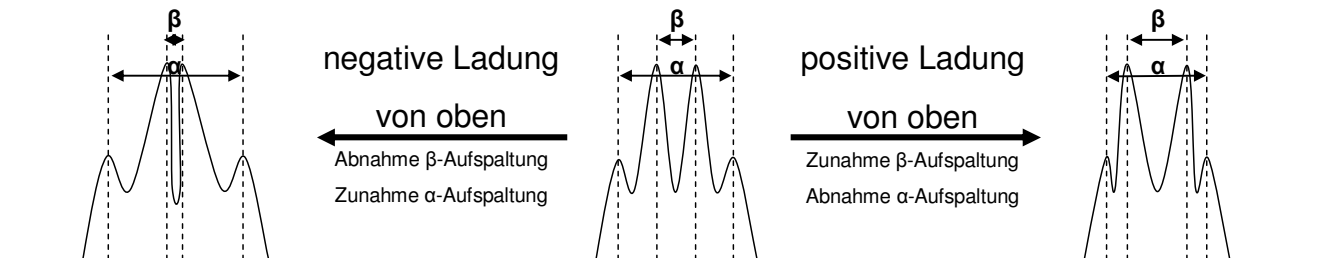


Abbildung 19: Wirkung einer positiven und einer negativen Ladung von oben auf die Lipiddoppelschicht in Form der Veränderung der α - und β -Aufspaltung.

3.2.3.1 Einfluss der Temperatur auf die Aufspaltungen

Da die Aufspaltungen in einem Deuterium-Spektrum von der Orientierung des zu untersuchenden Molekülsegments zur Membrannormalen und der Beweglichkeit der entsprechenden Gruppe abhängt und besonders letzteres zu einem gewissen Grad von der Temperatur abhängt, wurde für die reine Lipidprobe eine Temperaturserie gemessen. Es sollte zudem sichergestellt werden, dass sich die verwendete Temperatur oberhalb des Phasenübergangs des Lipids, also in der flüssig-kristallinen Phase, befindet. Abbildung 20 zeigt den Einfluss der Temperatur. Die α -Aufspaltung verändert sich kaum bei einer Temperaturerhöhung von 300 K auf 320 K. Anders verhält es sich bei der β -Aufspaltung. Diese nimmt bei zunehmender Temperatur etwas ab.

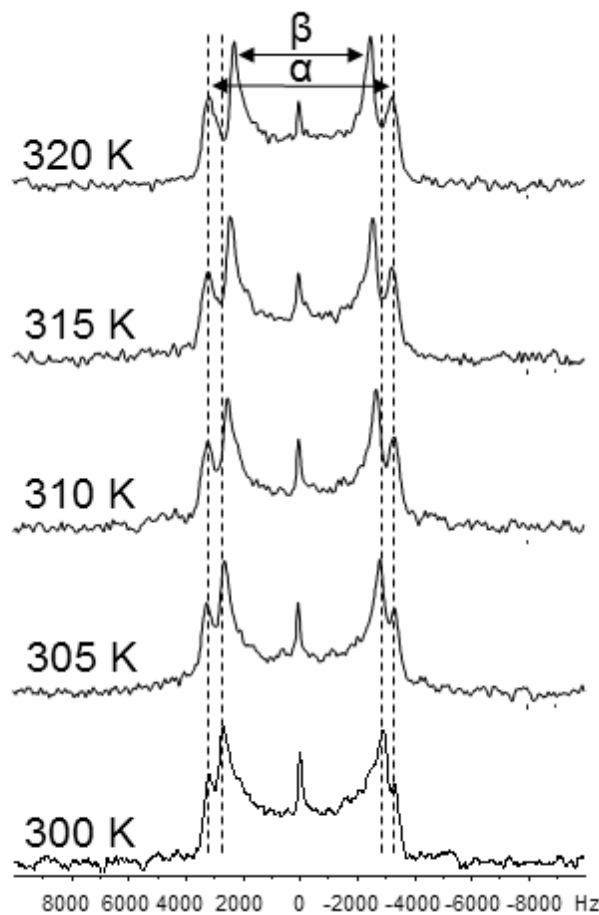


Abbildung 20: Temperatureinfluss auf die α - und β -Aufspaltung der Lipide.

Dieser Effekt wurde bereits in der Literatur beschrieben und es wird dort vermutet, dass es sich um eine Konformationsänderung in der Kopfgruppe handelt. Die erhöhte thermische Bewegung der Lipide könnte der Kopfgruppe des einzelnen Lipids aufgrund einer größeren Fläche/Lipid eine veränderte Konformation ermöglichen, die zuvor sterisch benachteiligt war. Eine mögliche derartige Änderung ist in Abbildung 21 beschrieben.

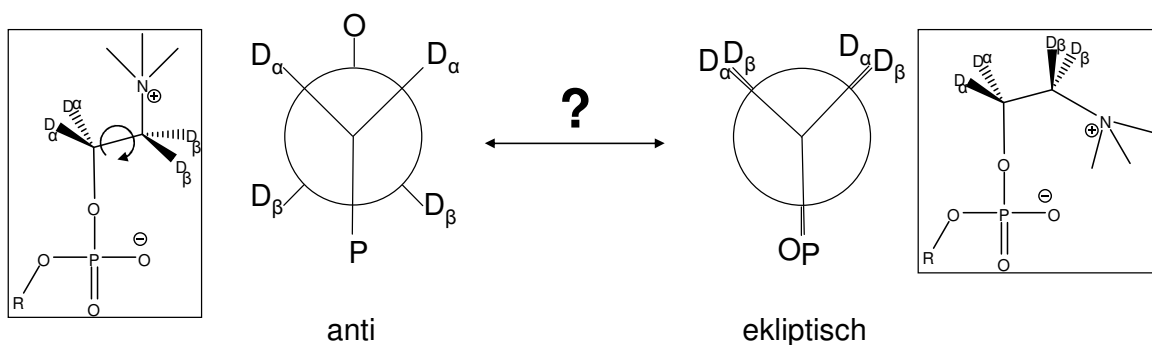


Abbildung 21: Mögliche Rotationskonformere der Phosphocholin-Kopfgruppe als Keilstrichformel und in der Newman-Projektion.

Die plausible Erklärung für diesen Effekt ist jedoch die unterschiedliche Beweglichkeit der beiden im Lipid befindlichen Positionen der CD₂-Gruppen, die bei einer dynamischen Konformationsänderung auftritt (siehe Abb. 22).

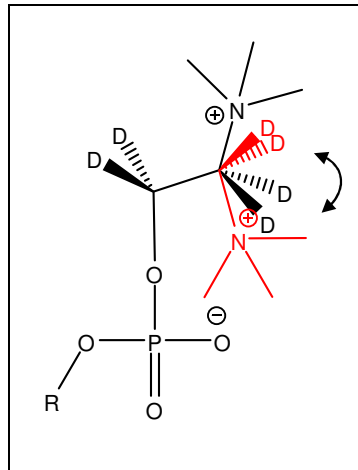


Abbildung 22: Mögliche Dynamik der Phosphocholin-Kopfgruppe, die die unterschiedliche Beweglichkeit der beiden CD₂-Positionen veranschaulicht.

Um bei den weiteren Experimenten in der richtigen Phase zu messen, wurde von hier ab eine Temperatur von 310 K gewählt. Zum einen war die Temperaturabhängigkeit im Bereich von 300 K bis 320 K gering, zum anderen befanden sich die DMPC-Lipide bei dieser Temperatur definitiv oberhalb des Phasenübergangs und zusätzlich waren 310 K noch eine moderate Temperatur bezüglich der Austrocknung der Probe.

3.2.3.2 Einfluss des Protein/Lipid-Verhältnisses auf die Quadrupolaufspaltung

Nachdem der Temperaturbereich der weiteren Experimente auf 310 K festgelegt wurde, sollte nun das Verhalten der Quadrupol-Aufspaltungen bei verschiedenen Protein/Lipid-Verhältnissen untersucht werden. Hierzu wurde, wie bei den Relaxationsmessungen, das vollständige TatA_d 2-70 Protein verwendet. Wie Abbildung 23 zeigt, konnte nur ein sehr geringer Einfluss auf die α-Aufspaltung beobachtet werden. Hingegen zeigte sich im Fall der β-Aufspaltung bei steigender Proteinmenge ein zunehmender Effekt. Die β-Aufspaltung nahm bei einem Protein/Lipid-Verhältnis von 1:50 merklich ab. Da bei diesem Verhältnis eine charakteristische Veränderung beobachtbar war, wurde dieses Protein/Lipid-Verhältnis für alle weiteren Messungen verwendet.

TatA_d 2-70 : DMPC

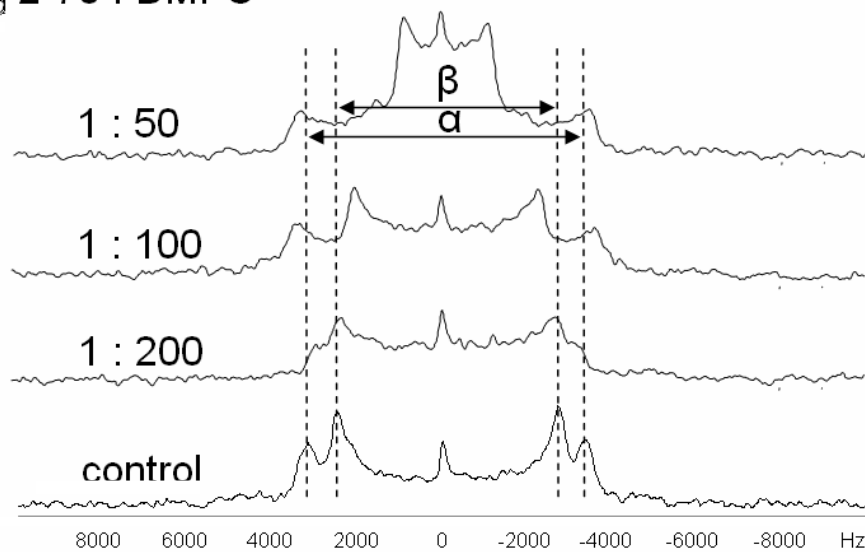


Abbildung 23: Einfluss des Protein/Lipid-Verhältnisses auf die α - und β -Aufspaltung der Lipide.

Da das ^2H -NMR Spektrum zwei gut aufgelöste Quadrupol-Aufspaltungen zeigt, kann zusätzlich geschlossen werden, dass die Lipide in einer homogenen Umgebung eingebettet sind.

3.2.3.3 Untersuchung der Quadrupol-Aufspaltung der verschiedenen TatA_d-Fragmente

Um eine Vorstellung der zugrunde liegenden Wirkung des Proteins auf die Lipide zu gewinnen, wurden weitere ^2H -NMR-Experimente mit den verschiedenen TatA_d-Fragmenten durchgeführt. Da die gewählten Konstrukte an die bekannten Sekundärstruktur motive des TatA_d Proteins angepasst waren, konnte mit Hilfe eines Vergleichs untereinander der Effekt der einzelnen Sekundärstrukturbereiche auf die Kopfgruppen der Lipide abgeschätzt werden. Abbildung 24 zeigt den Effekt der verschiedenen Fragmente auf die Aufspaltung.

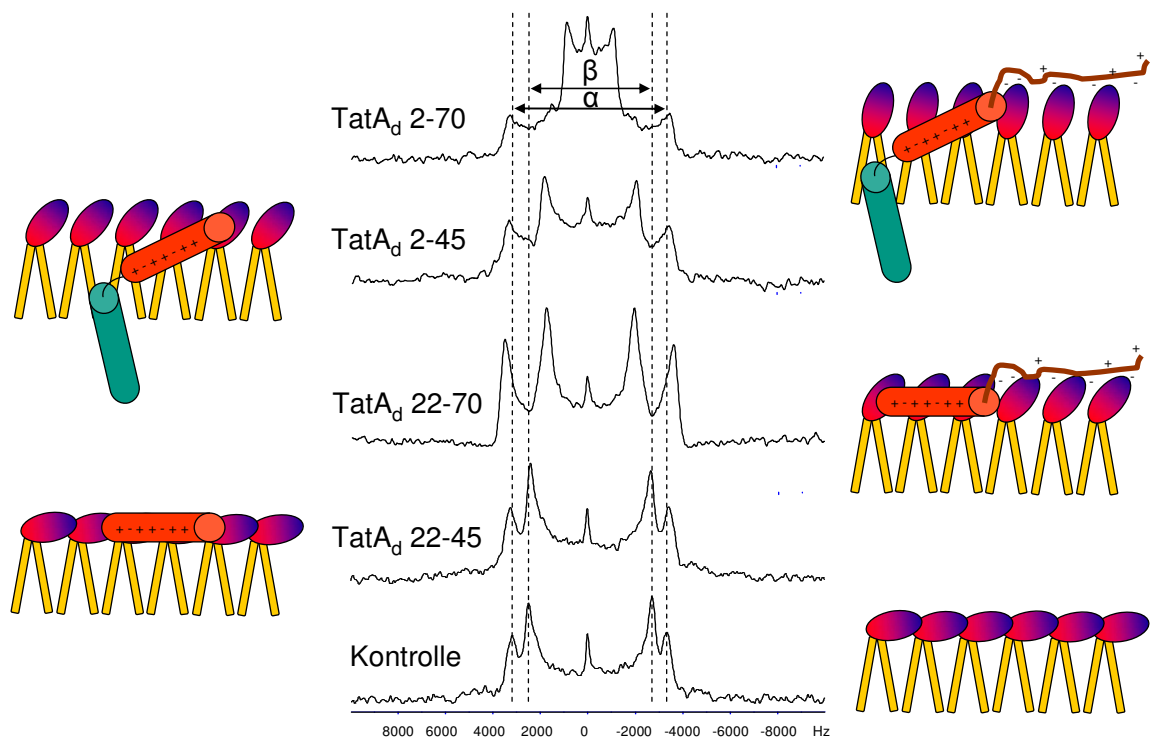


Abbildung 24: Unterschiedliche α - und β -Aufspaltung der Lipide durch den Einfluss des entsprechenden Fragments.

Generell ist kein oder nur ein minimaler Effekt auf die α -Aufspaltung zu detektieren, jedoch zeigen sich durchaus Unterschiede im Verhalten der β -Aufspaltung, was eine ähnliche Veränderung der Kopfgruppe wie bei einer Temperaturerhöhung vermuten lässt. Der erwartete Effekt einer Verbreiterung der β -Aufspaltung und einer Verschmälerung der α -Aufspaltung, der durch TatA_d 22-45, das nur die positiv geladene amphiphile Helix des TatA_d Proteins darstellt, eintreten sollte, wurde nicht beobachtet. Das Fragment TatA_d 22-45 zeigte keinen Effekt auf die Quadrupol-Aufspaltungen, was die Vermutung zulässt, dass dieses abgeschnittene Konstrukt eventuell nicht mehr als Helix vorliegt und von beiden Enden her aufgewunden sein könnte. Die Konstrukte TatA_d 2-45 und TatA_d 22-70 zeigten beide eine Verschmälerung der β -Aufspaltung in gleichem Maße. Somit konnte sowohl der transmembranen hydrophoben α -Helix als auch dem negativ geladenen vermutlich unstrukturierten C-Terminus ein ähnlicher Effekt zugeordnet werden. TatA_d 2-70 zeigt in etwa eine doppelt so starke Verminderung der β -Aufspaltung, was vermuten lässt, dass sich hier die beiden beobachteten Effekte von TatA_d 2-45 und TatA_d 22-70 addieren. Die beobachteten Veränderungen der Aufspaltungen können vereinfacht als Änderung der Lipidkopfgruppen veranschaulicht werden. Normalerweise sind die

Kopfgruppen des DMPC-Lipids mit ihrem Dipol parallel zur Membranoberfläche angeordnet, wodurch sie sich stabilisieren können. Abbildung 25 zeigt die Veränderung der Phosphocholin-Gruppe entsprechend der elektrostatischen Wechselwirkung mit einem positiven bzw. negativen Sekundärstrukturelement des TatA_d-Proteins.

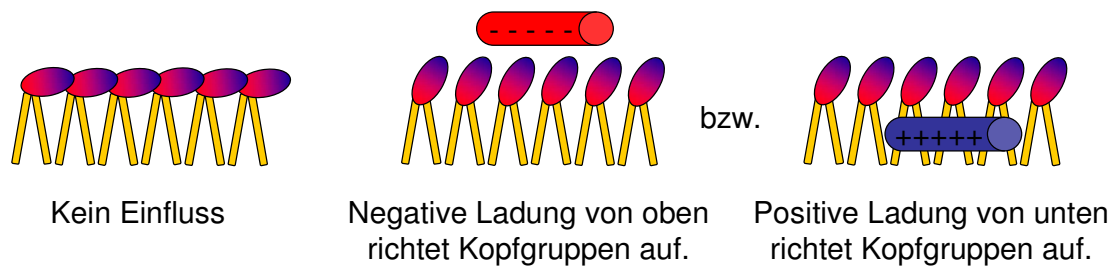


Abbildung 25: Einfluss einer negativen Ladung von oben bzw. einer positiven Ladung von unten auf die Phosphocholin-Gruppe der DMPC-Lipide.

Es zeigt sich, dass sowohl eine negative Ladung von oben auf die Membran, als auch eine positive Ladung von unten auf die Phosphocholin-Gruppen, zu einem Aufrichten der Kopfgruppen der Lipide führt.

Da bei dem eigentlich amphiphilen, kationischen Konstrukt TatA_d 22-45 nicht die erwartete Verbreiterung der β -Aufspaltung und Verschmälerung der α -Aufspaltung eingetreten war, wurde zur Kontrolle zudem die Aufspaltung einer Probe mit dem bekannten α -helikalen, kationischen Amphiphil PGLa gemessen (siehe Abb. 26 und Tab. 5).

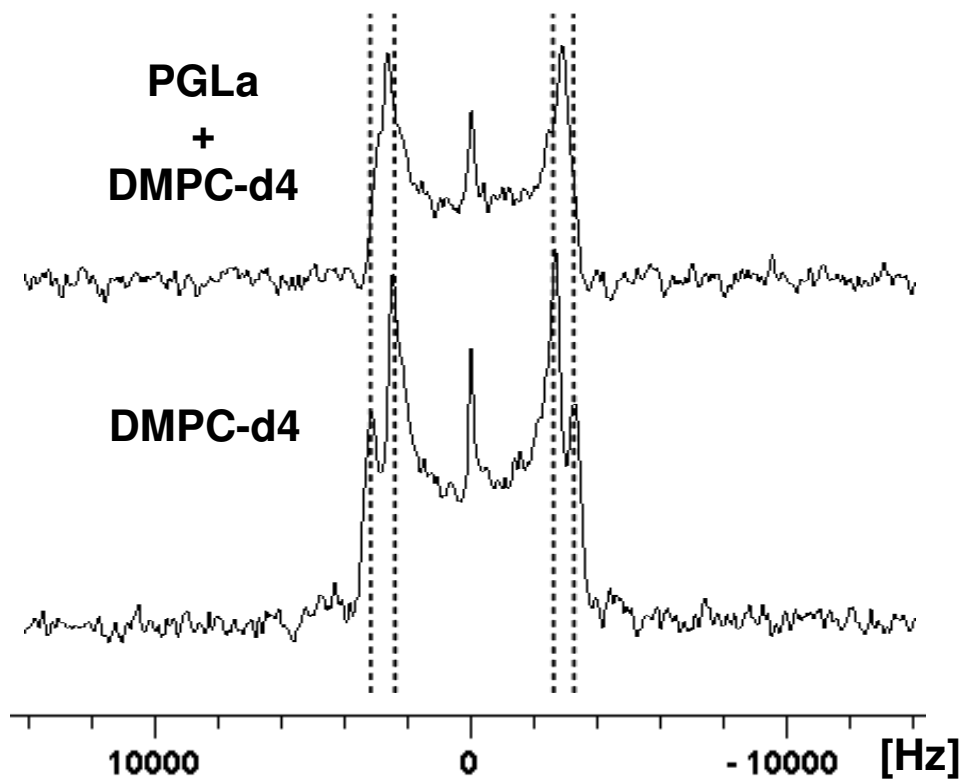


Abbildung 26: α - und β -Aufspaltung von PGLa in DMPC-d4 im Vergleich zu einer reinen DMPC-d4-Kontrollprobe.

	Kontrolle	PGLa P/L 1:50
T_1	24,86 $\pm 0,69$ ms	23,67 $\pm 1,12$ ms
T_2	2,42 $\pm 0,14$ ms	3,94 $\pm 0,32$ ms
α -Aufspaltung	6,52 kHz	5,55 kHz
β -Aufspaltung	5,20 kHz	5,55 kHz

Tabelle 5: Abweichung der T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten und der α - und β -Aufspaltung einer PGLa/DMPC-d4-Probe im Vergleich zu einer reinen DMPC-d4-Kontrollprobe.

Wie erwartet, zeigte dieses Peptid eine Verschmälerung der α -Aufspaltung und eine Vergrößerung der β -Aufspaltung. Dieses Ergebnis bestätigt zusätzlich die Annahmen und die Qualität der vorausgegangenen Messungen der TatA-Konstrukte.

3.3 Neutronenstreuungsexperimente zur Untersuchung der Wechselwirkung der einzelnen Komponenten des Tat-Systems

Kleinwinkel-Neutronenstreuung (engl. Small angle neutron scattering - SANS) ermöglicht Aussagen über die Größe und Form von Objekten in verschiedenen Medien zu treffen. Auch bei der Untersuchung von Proteinen bzw. Proteinkomplexen in mehrschichtigen Lipiddoppelschichten können hiermit sowohl Konformationsänderungen als auch Cluster-Bildungen untersucht werden.⁹⁵ Im Fall der Tat-Translokase von *B. subtilis* konnte für die Membrankomponente TatA_d durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass dieses Protein die Fähigkeit besitzt sich zusammen zu lagern und die porenbildende Einheit des Tat-Systems bildet.^{50,51} Durch SANS kann ebenso die Proteinverteilung detektiert, aber auch die Formation bzw. Komplexbildung mehrerer Komponenten untersucht werden. Daher sollte diese Methode Aufschluss darüber geben, welche der verschiedenen Komponenten die größte Affinität füreinander besitzen, um eine Aussage über die Erkennung der Proteine untereinander in der Membran treffen zu können. Durch das Streuverhalten der eingestrahlten Neutronen ist es bei dieser Methode möglich eine Probe auf Objekte in der Membranebene zu analysieren. Da Neutronenbeugung auf der Streuung von Neutronen mit den Atomkernen basiert, können im Vergleich zu Röntgenbeugungsexperimenten, die eine Interaktion der Röntgenstrahlen mit der Elektronenhülle eines Moleküls oder Komplexes darstellen, auch verschiedene Isotope eines Elements unterschieden werden. Besonders bei der Untersuchung biologischer Systeme kann die stark unterschiedliche Streuung der Wasserstoff-Isotope vorteilhaft genutzt werden. Durch gezielte Deuterierung von Teilen der Probe kann der Kontrast zwischen den verschiedenen Bereichen des Streuobjekts so gewählt werden, dass sich die gewünschten Teile der Probe im Streuverhalten vom Rest absetzen und dadurch sichtbar werden. Bereiche, die sich nicht voneinander absetzen, besitzen die gleichen Streueigenschaften, was auch „contrast match“ genannt wird. In biologischen Protein-Lipid-Systemen kann durch diese Eigenschaft entweder Informationen über das Protein oder die Membran gewonnen werden. Da Protein-Lipid-Proben vor jeder Messung rehydratisiert werden müssen, kann an dieser Stelle der Probenvorbereitung ein geeignetes D₂O/H₂O-Verhältnis gewählt werden, um die entsprechend deuterierte Komponente

„unsichtbar“ erscheinen zu lassen. Beim Kontakt der Neutronen mit der Probe tritt mittels Energie- und/oder Impulsaustausch Streuung auf. Bei der elastischen Streuung wird keine Energie ausgetauscht, sondern es findet lediglich ein Impulsübertrag statt. Informationen über die Größe der zu untersuchenden Molekülkomplexe und den Abstand einzelner Objekte können aus dem Winkel (θ) zwischen dem eingestrahlt (k_i) und dem resultierenden (k_f) Impulsvektor gewonnen werden. Je kleiner der streuende Bestandteil ist, desto größer fällt der Beugungswinkel θ aus. Der Impulsübertrag Q , der die Differenz von gebeugtem und eingestrahlt Impulsvektor darstellt (siehe Abb. 27(A)), steht in direktem Zusammenhang mit dem Beugungswinkel. Da die orientierten Proben bei den Experimenten mit der Membranebene im rechten Winkel zur Einstrahlrichtung angeordnet sind, können durch den entstehenden Impulsübertrag Q Objekte in der Membranebene untersucht werden (siehe Abb. 27(B)). Die Intensität $I(Q)$ wird bei einem kleinen Impulsübertrag Q größer, je größer das Streuobjekt ist. Die Größe und Form des Objekts können letztendlich aus der Intensitätenverteilung $I(Q)$ ermittelt werden.

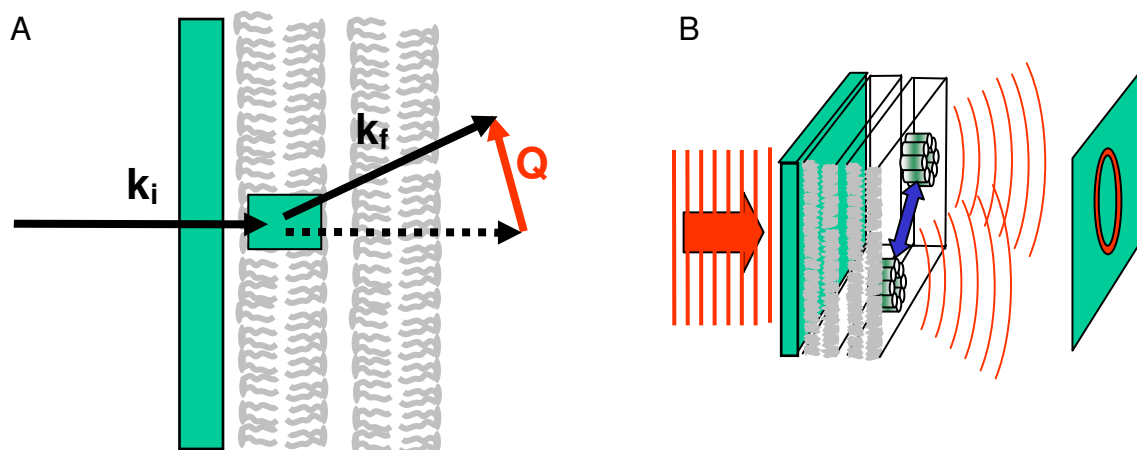


Abbildung 27: (A) Zusammenhang zwischen der Einstrahlrichtung (k_i) dem gebeugten Ausfallswinkel (k_f) und dem Impulsübertrag Q . (B) Schema der Orientierung der beobachtbaren Objekte in der Membran und resultierendes Spektrum auf dem Detektor. (Dr. Stephan L. Grage, KIT Karlsruhe)

Die Kleinwinkel-Neutronenbeugungs-Experimente wurden mit der Hilfe von Dr. Phil Callow und Dr. Susanna Teixeira am Hochfluss-Instrument D22 am Institut Laue-Langevin in Grenoble durchgeführt. Mittels der SANS-Experimente konnten die unterschiedlichen Interaktionen der einzelnen Komponenten des Tat-Systems von PhoD aus *B. subtilis* miteinander verglichen werden. Deshalb wurden die undeuterten Proteine in Ketten-deuterten DMPC-d54-Lipiden auf Glasplättchen

rekonstituiert und, um die Lipide im Mittel zu „matchen“, mit D₂O rehydratisiert. Somit konnte nur das Signal der undeuterten Proteinkomplexe detektiert werden. Das Protein zu Lipid Verhältnis variierte von ca. 1:75 bis 1:100 (mol/mol). Die Proteine TatA_d:TatC_d:SP besaßen in den entsprechenden Proben zueinander das Verhältnis 10:1:2. Als Kontrolle dienten eine reine DMPC-d54-Probe, das Streuverhalten der leeren Probenküvette und eine Testprobe aus der stark Neutronen-absorbierenden Cadmiumverbindung B4C.

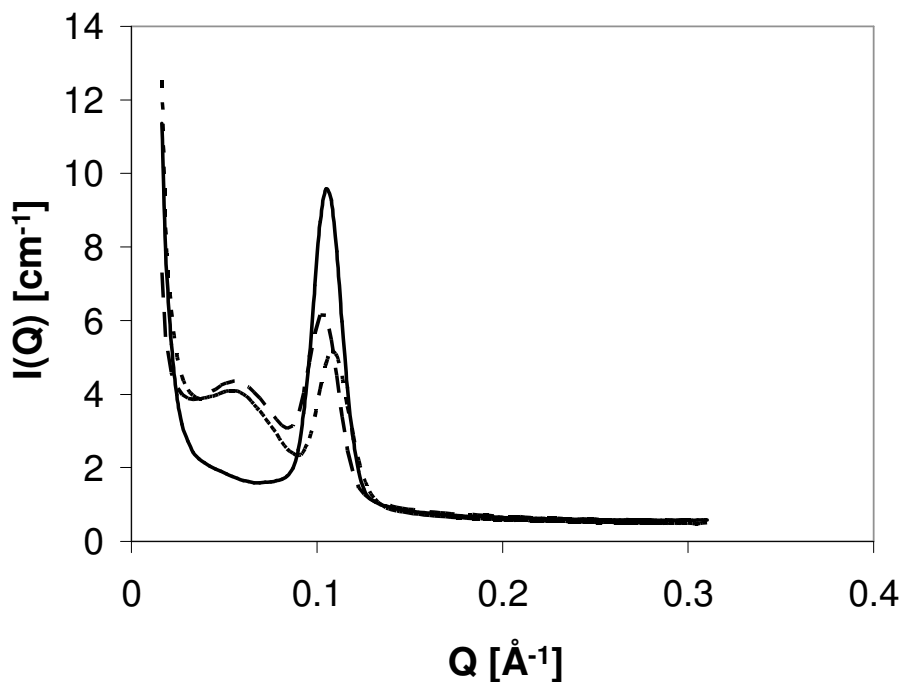


Abbildung 28: SANS-Intensitätenverteilung der Streuobjekte DMPC-d54 (—), TatA_d 2-45 in DMPC-d54 (— —) und TatA_d 2-45 mit SP in DMPC-d54 (-----).

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, tritt auch bei der Kontrollprobe aus reinen DMPC-d54-Lipiddoppelschichten bei $Q \cong 0,1 \text{ \AA}^{-1}$ ein erhöhter Wert für die Intensität auf. Signale bei Streuwinkeln dieser Größenordnung werden von Defekten in der Lipiddoppelschicht erzeugt und haben somit keinen Zusammenhang mit den eigentlichen Protein-Zusammenlagerungen. Die übereinanderliegenden Membranen, die wie bekannt jeweils aus einer Lipiddoppelschicht bestehen, verschließen sich selbst an den Defektstellen bzw. Löchern von einer Lipidschicht zur anderen. Dies führt dazu, dass nicht alle Lipide perfekt orientiert sind und eine Streuung an den fehlorientierten Lipiden auftritt. Da die Membranen an den Defektstellen zueinander wie mehrschichtige Lipiddoppelschichten orientiert sind und nun aber in Richtung des Impulsübertrags Q liegen, werden sie als Streuobjekte detektiert.

In Abbildung 28 ist zusätzlich die Streukurve des rekonstituierten verkürzten Konstrukts TatA_d 2-45 und einer Probe aus TatA_d 2-45 und dem Signalpeptid des Tat-Systems zu sehen. Wie zu erwarten clustert das reine TatA_d 2-45, da es die porenbildende Komponente der Tat-Translokase ist. Die vorkommende Intensität bei $Q \cong 0,06 \text{ \AA}^{-1}$ wird vermutlich von zusammengelagerten TatA Molekülen erzeugt. Da keine wesentliche Veränderung der Intensität durch Zugabe des Signalpeptids zu beobachten ist, gehen das TatA-Protein und das Signalpeptid von PhoD höchst wahrscheinlich keine direkte Bindung miteinander ein.

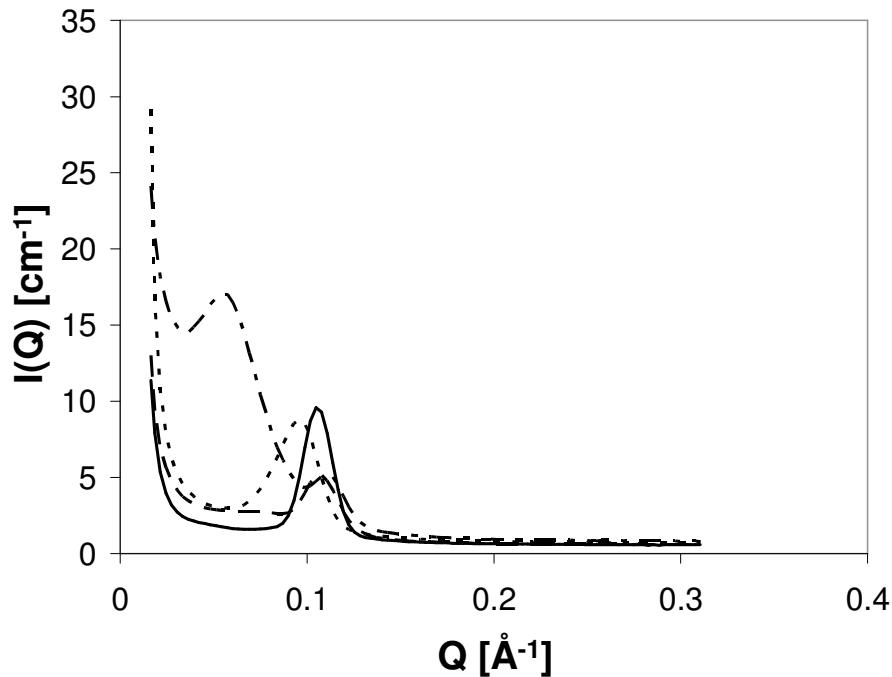


Abbildung 29: SANS-Intensitätenverteilung einer Probe aus reinen DMPC-d54-Lipiden (—), rekonstituiertem TatC_d (— —), rekonstituiertem SP (-----) und gemeinsam rekonstituiertem TatC_d und SP (— · — ·).

Abbildung 29 zeigt zum einen das Streuverhalten einer reinen Signalpeptid-Probe als auch das Verhalten einer reinen TatC_d-Probe. In beiden Fällen tritt im Vergleich zur reinen TatA-Probe keine Streuung an einem gebildeten Cluster auf, d.h. beide Proteine besitzen nicht die Fähigkeit zur Selbstzusammenlagerung oder zur Ausbildung großer Komplexe. Dieses zu erwartende Ergebnis bestätigt erneut die Theorie, dass nur das TatA-Protein die porenbildende Einheit darstellt.^{50,51} Werden jedoch Signalpeptid und TatC in einer Probe gemeinsam rekonstituiert, kann die Streuung an einem Objekt ähnlicher Größe wie der des TatA-Clusters beobachtet werden. Die Information, die aus der auftretenden Intensität gewonnen werden kann, deutet auf eine Interaktion des Signalpeptids mit der Membrankomponente TatC hin. Diese Interaktion bestätigt die vorhandene Vermutung, dass TatC an der Erkennung des Signalpeptids beteiligt sein soll.⁵⁶⁻⁵⁸

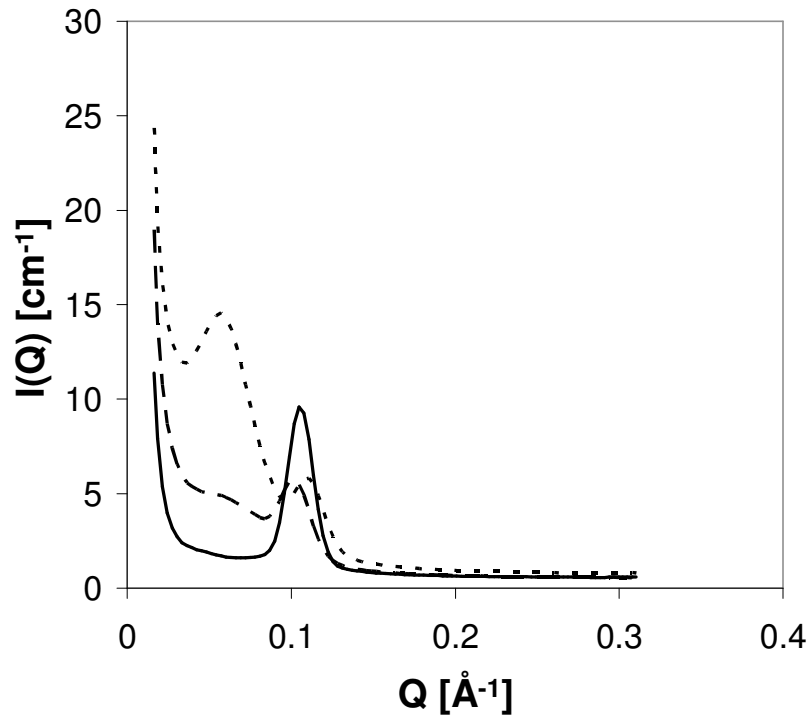


Abbildung 30: SANS-Intensitätenverteilung einer Probe aus reinen DMPC-d54-Lipiden (—), rekonstituiertem TatC_d und TatA_d 2-45 (— —) und rekonstituiertem TatC_d, TatA_d 2-45 und SP (-----).

In Abbildung 30 ist neben der Intensitätenverteilung der reinen DMPC-d54-Lipide die einer Probe mit gemeinsam rekonstituierten TatA_d und TatC_d zu sehen. Die Intensität und Größe des entstandenen Streuobjekts unterscheidet sich kaum von der einer reinen TatA_d-Probe. Vermutlich wird die Streuung dieser Probe ebenfalls von reinen TatA-Zusammenlagerungen verursacht. Interessant ist jedoch das Ergebnis der weiteren Messung. In diesem Fall wurde zusätzlich zur vorherigen Probe auch das Signalpeptid mit rekonstituiert. Hier bilden sich außerdem wieder verstärkt weitere Objekte bei $Q \cong 0,05 \text{ \AA}^{-1}$, die vermutlich von einer Assemblierung von TatC_d und dem Signalpeptid herrühren.

Zusammenfassend konnte mit diesen Kleinwinkel-Neutronenstreuungs-Experimenten bestätigt werden, dass sowohl die Eigenschaft von TatA, die Fähigkeit zur Selbstassemblierung, als auch die Affinität zwischen TatC_d und dem Signalpeptid sehr wahrscheinlich ist.

4 Diskussion

4.1 Das Signalpeptid von PhoD aus *B.subtilis*

Amphiphile Helices als Strukturelement in Proteinen stellen eine Möglichkeit dar, mit Hilfe derer eine Bindung zu einer Membran eingegangen werden kann. In den meisten Studien über Tat-Systeme in unterschiedlichen Organismen wird jedoch von einer elektrostatischen Anziehung zwischen den positiv geladenen Aminosäuren im N-terminalen Bereich der Signalpeptide und den negativ geladenen Kopfgruppen der Membranlipide als die zugrunde liegende Wechselwirkung ausgegangen. Als einen weiteren Schritt der Translokation wird oft eine darauf folgende Insertion der hydrophoben h-Domäne in die Lipiddoppelschicht vermutet. Wie in dieser Studie gezeigt werden konnte, befindet sich im Fall des Signalpeptids von PhoD aus dem gram-positiven Bakterium *B.subtilis* eine amphiphile Helix in der N-terminalen Domäne. Die zu Beginn durchgeführten Zirkulardichroismus-Experimente ergaben einen α -helikalen Anteil in der Aminosäuresequenz des Signalpeptids von 20-25 %. Dieses Ergebnis wurde vorerst der hydrophoben Domäne des Signalpeptids zugeordnet, da in vorangegangenen Studien oft dem hydrophoben Kern der Signalpeptide eine α -helikale Struktur zugesprochen wird. Die darauf folgenden orientierten Zirkulardichroismus-Messungen führten jedoch zu einem unerwarteten Ausgang. Es wurde eine zur Membranoberfläche parallele Orientierung der helikalen Anteile des Signalpeptids gemessen, die nicht zur Idee einer membrandurchspannenden hydrophoben Helix passen. Die daraufhin detaillierte Analyse der Sekundärstruktur des Signalpeptids ließ eine neue Anschauung der Membraninteraktion dieser untersuchten Sequenz aufkommen. Im Gegensatz zu früheren Annahmen wurde nur eine niedrige Wahrscheinlichkeit für eine Helix im hydrophoben Kern der Sequenz und eine höher wahrscheinliche zwischen S5-K15 vorhergesagt. Um eine mögliche amphiphile Helix zu detektieren wurde das Profil des hydrophoben Moments einer α -Helix entlang der Aminosäuresequenz des Signalpeptids von jeweils 11 aufeinander folgenden Aminosäuren analysiert. Erstaunlicherweise zeigte sich das größte hydrophobe Moment im selben Bereich zwischen Aminosäure 5 und 15 des Signalpeptids, der auch die höchste Wahrscheinlichkeit für eine α -Helix aufwies. All die theoretischen Ergebnisse

zusammen unterstützen die Idee einer amphiphilen Helix im N-terminalen Bereich des Signalpeptids und geben eine Erklärung für die bisherigen experimentellen Befunde. Nicht nur die Länge der vorhergesagten Helix stimmt in etwa mit den Ergebnissen der Zirkulardichroismus-Messungen überein, sondern auch der vorhergesagte amphiphile Charakter dieses Segments geht mit der Annahme einer parallelen Anordnung zur Membranoberfläche, wie durch die orientierte Zirkulardichroismus-Spektroskopie ermittelt, einher. In der Literatur sind zwar mehrere Beispiele zu finden, in denen der hydrophobe Kern eines Tat-Signalpeptids eine α -Helix bildet, aber es gibt keine genauere Sekundärstrukturuntersuchung des Signalpeptids von PhoD aus *B.subtilis*. Zur genauen Lokalisation des helikalen Segments wurden $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Tripelresonanz-NMR-Spektroskopie-Experimente in Detergenz-Mizellen durchgeführt. Durch Vergleich der $\text{C}\alpha$ und $\text{C}\beta$ ^{13}C -chemischen Verschiebungen mit denen für die mittleren random-coil Werte für die entsprechenden Aminosäuren konnte ein weiterer Beweis für eine α -Helix in der N-terminalen Domäne (S5-K15) des Signalpeptids gefunden werden. Die NMR-Experimente wiesen aber auch auf einen zweiten möglichen helikalen Bereich im hydrophoben Kern der Sequenz (R26-V49) hin, der erstaunlicherweise mit der Vorhersage für die zweite Helix übereinstimmt. Durch schwache H_N -Wasserkontakte konnten im ^{15}N -editierten ^1H -NOESY dieselben zwei α -helikalen Regionen ermittelt werden. Die zweite Helix im hydrophoben Bereich des Signalpeptids ist jedoch in allen Ergebnissen weniger eindeutig als die im N-terminalen Bereich. Dieser Fakt ließ die Idee aufkommen, dass die Formation der zweiten Helix erst dann stattfindet, wenn das Signalpeptid sich in eine hydrophobe Umgebung eingelagert hat, wie z.B. eine Membran. Diese verspätete Helix-Formation ausgelöst durch den Kontakt mit Membranlipiden ist durchaus von anderen Signalsequenzen bekannt. Die Vorhersageprogramme sowie die Kernspinresonanz-Experimente deuten auf eine Unterbrechung der hydrophoben Helix in der Nähe der Aminosäure G38 hin. Dieses Ergebnis führte zur Überlegung, ob nicht ein spezieller Insertionsmechanismus des Signalpeptids von PhoD aus *B.subtilis* vorliegt, der wiederum bei anderen Signalsequenzen diskutiert wurde. Die gesammelten Ergebnisse weisen auf einen sogenannten „loop mechanism“ bzw. eine „loop-like insertion“ hin, die von anderen Organismen, wie z.B. der Thylakoid Delta pH Transportroute⁹⁶, der pro-Omp A Insertion in die innere Membran von *E.coli*⁹⁷ und von Signalsequenzen des Endoplasmatischen Retikulums⁹⁸, bekannt sind. Dieses Model geht von einem

Eintauchen zweier kurzer hydrophober helikaler Segmente, die durch einen „Knick“ voneinander getrennt sind, in die Lipiddoppelschicht aus, anstatt eines kompletten Durchspannens der Membran durch den hydrophoben helikalen Bereich. Die beobachtete Unterbrechung der postulierten hydrophoben Domäne der Signalsequenz von PhoD aus *B.subtilis* könnte eine ähnliche Membraninsertion wie im Falle eines „loop mechanism“ ermöglichen. Aufgrund dessen wurde folgendes Model, das in Abbildung 31 zu sehen ist, für die ersten Bindungsschritte des untersuchten Signalpeptids entworfen.

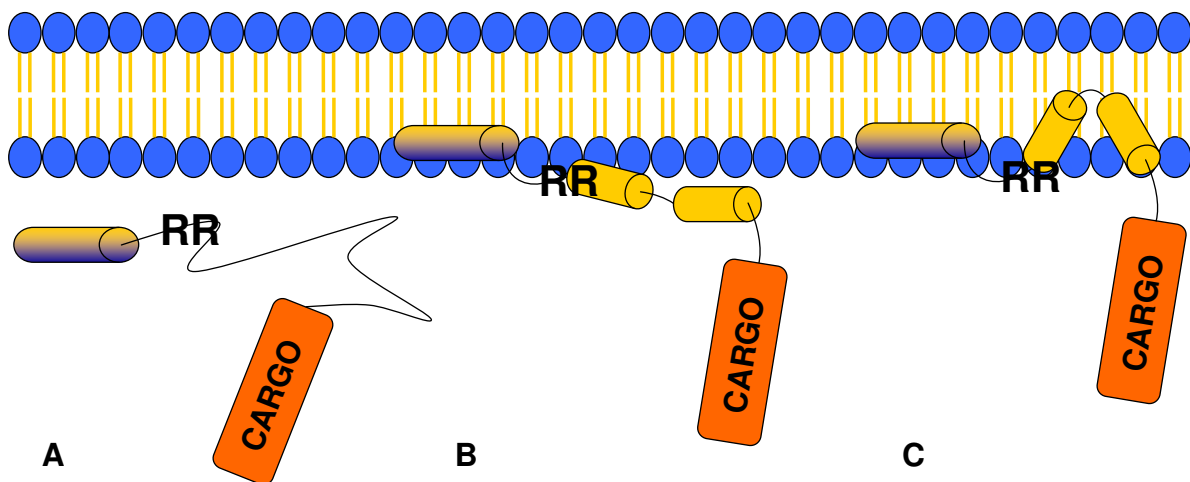


Abbildung 31: Vorgestelltes Model der ersten Bindungsschritte des Signalpeptids von PhoD aus *B.subtilis* zur Membran. Nachdem die amphiphile Helix der Signalsequenz an die Membran gebunden hat (A), wird hierdurch aufgrund der Nähe zur hydrophoben Umgebung die Formation einer zweiten Helix induziert (B). Die Unterbrechung der zweiten Helix in der hydrophoben Domäne um Aminosäure G38 legt eine Membraninsertion durch einen „loop mechanism“ nahe, anstatt einer transmembranen Durchspannung (C).

Nachdem die Signalsequenz mittels der amphiphilen Helix an die Membran gebunden hat, insertiert die entstehende hydrophobe Helix via einer Schleife in die Lipiddoppelschicht. Diese Art der Membraninsertion könnte dem Protein zur korrekten Faltung verhelfen mittels derer es in Kontakt mit z.B. TatC_d, einer der Membrankomponenten des Tat-Systems in *B.subtilis*, kommen könnte. Ein ähnliches Model, allerdings basierend auf einem Bindungsprozess mittels elektrostatischer Wechselwirkungen, wurde für die Signalpeptide von OmpA, TorA und DmsA⁷³ in *E. coli* aufgestellt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine amphiphile Helix in der N-terminalen Domäne der Signalsequenz von PhoD aus *B.subtilis* gefunden wurde, die deutlicher zu detektieren ist als die früher angenommene Helix im hydrophoben Bereich. Plausibel ist die Anlagerung des Cargo-Proteins mittels des amphiphilen Segments des Signalpeptids an die Lipiddoppelschicht als ersten Schritt dieser Translokation. Darauf folgend könnte das Protein lateral seinen vermutlichen

Rezeptor TatC_d und die porenbildende Komponente des Systems, TatA_d, erreichen. Das Model unterscheidet sich von früheren Annahmen in dem Punkt, dass nicht nur elektrostatische Wechselwirkungen für eine Membranbindung verantwortlich gemacht werden, sondern eben auch die hydrophobe Wechselwirkung der n-Domäne, die eine amphiphilen Helix ermöglicht, berücksichtigt wird.

4.2 Wechselwirkung des TatA_d mit der Lipiddoppelschicht

Im Vergleich zum Signalpeptid von prePhoD aus *B.subtilis* ist das TatA_d Protein als zweite von drei Komponenten dieses Systems ein reines Membranprotein. Aber auch in diesem Fall stellte sich die Frage nach der detaillierten Wechselwirkung mit der Lipiddoppelschicht. Der generelle Aufbau und die Sekundärstrukturmotive waren aufgrund von früheren Studien aus unserem Arbeitskreis⁹⁹⁻¹⁰¹ (siehe Dissertation Torsten Walther, KIT-Karlsruhe, 2010) bereits bekannt. Demnach ist das TatA_d Protein in drei Segmente unterteilbar wie in Abbildung 32 veranschaulicht.



Abbildung 32: Die drei vorhandenen Strukturelemente des TatA_d-Proteins.

Es ist unterteilt in einen hydrophoben helikalen N-terminalen Bereich (TMS) gefolgt von einer amphiphilen positiv geladenen Helix (APH) und in einen negativ geladenen vermutlich unstrukturierten C-Terminus. Durch Kernspinresonanzexperimente konnte weiterhin die genaue Lage bzw. Orientierung der beiden helikalen Bereiche geklärt werden (siehe Abb. 33).

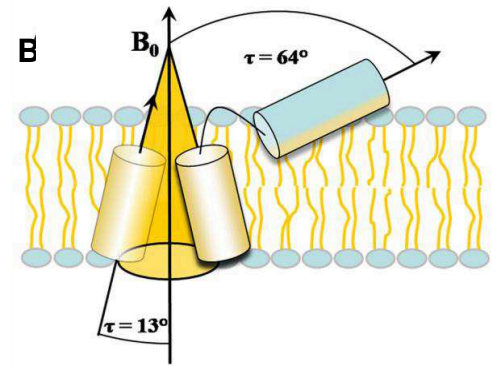
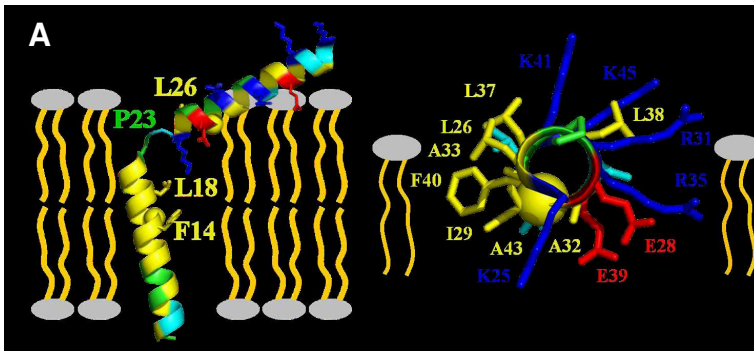


Abbildung 33(A) und 33(B): Ein auf experimentellen und theoretischen Daten basierendes Strukturrechnungsmodell von TatA_d (siehe Dissertation Torsten Walther, KIT-Karlsruhe, 2010).

In dieser Arbeit sollte nun die Wechselwirkung des TatA_d-Proteins bzw. der verschiedenen Bereiche dieser Membrankomponente genauer untersucht werden. Mit Hilfe der zuerst durchgeführten ²H-NMR-Relaxationsmessungen an deuterierten Lipiden konnte gezeigt werden, dass das Protein sowie einzelne verwendete Fragmente des vollständigen TatA_d keinen Einfluss auf die longitudinale Relaxation (T₁-Wert) der Lipidkopfguppen besitzen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass kein Einfluss auf die Bewegungen der Lipidkopfguppe im Bereich der schnellen Zeitskala stattgefunden hat. Anders verhält es sich bei der transversalen Relaxation (T₂-Wert). Beide Konstrukte mit vorhandenem negativ geladenen C-Terminus, TatA_d 2-70 und TatA_d 22-70, wiesen erhöhte Spin-Spin-Relaxationszeiten auf. Eine Erhöhung der Relaxationszeit bedeutet eine langsamere Relaxation. Bei Betrachtung der T₂-Relaxationszeit bedeutet dies eine Verringerung der Bewegungen im Bereich der langsamen Zeitskala.

Zusätzliche ²H-NMR-Experimente zur Interpretation der Quadrupol-Aufspaltung sollten eine genauere Einsicht der vorhandenen Wechselwirkungen geben. Nachdem sich 310 K und ein Protein/Lipid-Verhältnis von 1:50 als optimale Bedingungen herausgestellt hatten, wurden Proben mit allen Fragmenten sowie mit TatA_d in voller Länge gemessen. Aufgrund der Literatur und der bekannten Struktur wurde eine Verschmälerung der α -Aufspaltung und Verbreiterung der β -Aufspaltung aufgrund der positiv geladenen amphiphilen α -Helix erwartet. Es zeigte sich jedoch vorerst Erstaunliches nicht nur bei TatA_d, sondern auch bei allen anderen verwendeten TatA_d-Konstrukten. Alle Proteine zeigten, wenn überhaupt, nur einen marginalen Einfluss auf die α -Aufspaltung. Eine Erklärung liefert der unterschiedliche Einfluss der Proteine auf die beiden Positionen der Deuteronen in der Lipidkopfguppe. Ob

die C β D₂-Gruppe einer größeren Dynamik ausgesetzt ist oder ob die Ursache in der entsprechenden Konformationsänderung der Kopfgruppe zu suchen ist, bleibt offen. Jedoch wurde bei allen Konstrukten eine Verschmälerung der β -Aufspaltung detektiert, außer im Fall der reinen amphiphilen α -Helix (TatA_d 22-45). Dieses Fragment zeigt als einziges keinen Einfluss auf die Aufspaltungen. Eine mögliche Erklärung für die nicht vorhandene Wechselwirkung des TatA_d 22-45 könnte eine N- und C-terminale Aufwindung der amphiphilen Helix sein. Da dieses Fragment nicht von weiteren Aminosäuren flankiert wird, könnte die Sekundärstruktur gestört und somit die Bindung unterbunden sein. Interessant ist aber das Verhalten von TatA_d 2-70, TatA_d 2-45 und TatA_d 22-70 in Bezug auf die β -Aufspaltung. TatA_d 2-45 und TatA_d 22-70 weisen eine Verschmälerung der β -Aufspaltung in etwa dem gleichen Maß auf. Da eine Verschmälerung der β -Aufspaltung eigentlich durch ein negativ geladenes Amphiphil erzeugt wird, stellte sich die Frage welche Bereiche der Konstrukte diesen Effekt verursachen. Normalerweise tritt eine Verschmälerung der β -Aufspaltung nur durch die Einwirkung einer negativen Ladung von oben auf die Membranoberfläche auf. Bei der Betrachtung der Daten in vollem Überblick entstand schließlich folgende Idee. Da TatA_d 22-70 einen negativ geladenen C-Terminus besitzt, ist es durchaus möglich, dass dieser entweder auf der Membranoberfläche „schwimmt“ oder durch eine teilweise gezippte (siehe ZIP-Model Dissertation Torsten Walther, KIT-Karlsruhe, 2010) Anordnung, die durch eine oder mehrere intramolekulare Salzbrücken vorhanden sein könnte, mit den Kopfgruppen der Lipide in Kontakt kommen kann. Dieser Einfluss entspräche einer negativen Ladung von oben auf die Membranoberfläche, die eine Verschmälerung der β -Aufspaltung verursachen würde. Warum TatA_d 2-45 dieselbe β -Aufspaltung verursacht, obwohl der negativ geladene C-Terminus nicht vorhanden ist, konnte durch eine weitere Überlegung geklärt werden. Da die transmembrane α -Helix (TMS) nicht den gesamten hydrophoben Bereich der Membran durchspannen kann, wird die amphiphile Helix teilweise in bzw. unter die Kopfgruppen in den hydrophoben Bereich der Lipide gezogen. Dies bewirkt dass positive Ladungen unter den Kopfgruppen zu liegen kommen und entspräche demselben Effekt wie negative Ladungen von Außen auf die Lipiddoppelschicht. Durch diesen „Ankereffekt“ kann es schließlich zu einer Verschmälerung der β -Aufspaltung kommen. Abbildung 34 zeigt das Model im Überblick.

Der transmembrane Anker zieht die positiv geladene amphiphile Helix in bzw. unter die Phosphocholin –Kopfgruppe

→ Gleicher Effekt wie der einer negativen Ladung auf die Oberfläche der Membran

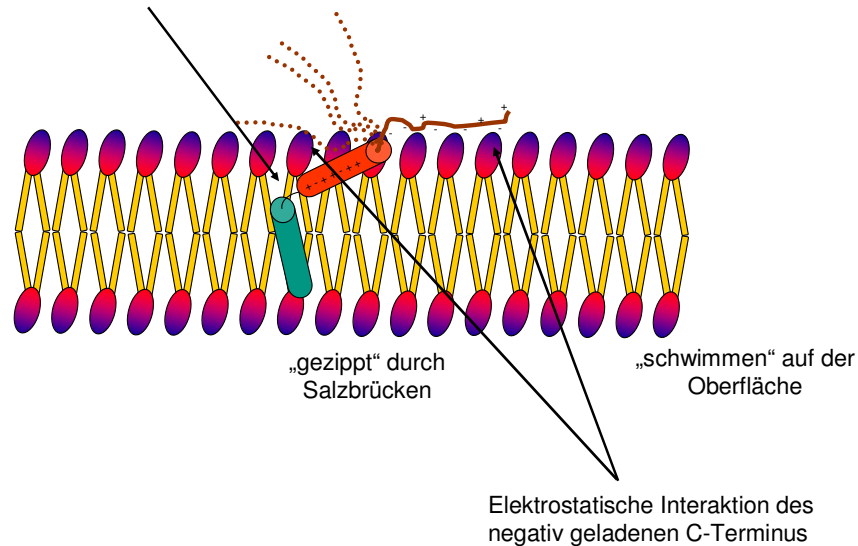


Abbildung 34: Effekte der verschiedenen Bereiche des TatA_d-Proteins auf die Kopfgruppen der Lipide.

Im Falle des vollständigen TatA_d-Proteins sind höchst wahrscheinlich beide Effekte vorhanden. Sowohl der negativ geladene C-Terminus kann auf der Oberfläche der Membran zu liegen kommen als auch der „Ankereffekt“ kann auftreten. Dies würde auch die etwa doppelte Verschmälerung der β -Aufspaltung, was einer Summe der Verschmälerung der β -Aufspaltung durch die einzelnen Effekte gleichkommt, im Falle von TatA_d 2-70 erklären. TatA_d 2-45, dem Konstrukt mit abgeschnittenem C-Terminus, würde demnach die elektrostatische Stabilisation fehlen, wohingegen TatA_d 22-70, dem Konstrukt ohne transmembrane Helix, der „Membrananker“ fehlen würde. Abbildung 35 zeigt die verschiedenen Fragmente in entsprechender Weise ihres Einflusses auf die Kopfgruppen noch einmal im Überblick.

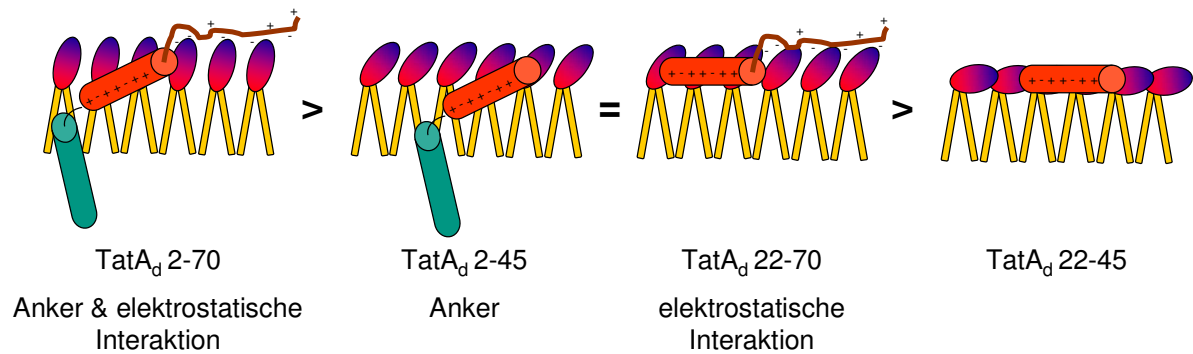


Abbildung 35: Reihenfolge des Einflusses der verschiedenen TatA_d-Fragmente auf die Neigung der Kopfgruppe von DMPC.

4.3 Wechselwirkung der Komponenten des Tat-Systems von *B. subtilis* untereinander

Aus den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit konnte eine präzisere Vorstellung der Wechselwirkung des Signalpeptids und der Membrankomponente TatA_d mit der Lipiddoppelschicht aufgezeigt werden. Da auch die letzte Komponente des Tat-Systems, das zweite Membranprotein TatC_d, natürlicherweise in der Lipidmembran anzutreffen ist, sollte die Wechselwirkung aller Komponenten untereinander in Membranen untersucht werden. Eine geeignete Methode stellte hier die Kleinwinkel-Neutronenstreuung dar, die es ermöglicht Objekte bzw. zusammengelagerte Komplexe in Membranen zu detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass TatA-Moleküle miteinander assemblieren und somit detektierbare Streuobjekte bilden. Diese Streuobjekte könnten aus vereinzelt TatA-Poren bestehen, die sich spontan zusammenlagern. Interessanter für den gesamten Mechanismus des Tat-abhängigen Transports sind jedoch die weiteren Ergebnisse. Es konnte im Gegensatz zu TatA keine spontane Zusammenlagerung sowohl von reinen TatC_d - Molekülen, als auch von reinen Signalpeptid-Molekülen beobachtet werden. Ebenso bilden gemeinsam rekonstituiertes TatA und TatC_d keine zusätzlichen Streuobjekte außer den schon in der reinen TatA_d-Probe vorhandenen Zusammenlagerungen. Die Messungen einer Probe aus TatC_d, TatA_d und Signalpeptid, als auch TatC_d und Signalpeptid alleine, zeigten jedoch einen starken Intensitätsanstieg bei einem $Q \cong 0,06 \text{ \AA}^{-1}$, der für Komplexe einer Größe von ca. 100 \AA , ähnlich wie die der TatA-Pore, steht ($d = 2\pi/Q$). Hieraus konnte geschlussfolgert werden, dass sich beim Zusammentreffen von TatC_d und Signalpeptid, nicht wie bei den einzelnen reinen Komponenten, Objekte dieser Größe ausbilden. Dies kann als eine Interaktion zwischen TatC_d und

Signalpeptid angesehen werden. Die hohe Intensität $I(Q)$ bei $Q \cong 0,06 \text{ \AA}^{-1}$ lässt sich auf ein häufiges Auftreten von Komplexen der Art TatC-SP, TatC_x-SP bzw. TatC-SP_x zurückführen. Die Beobachtung von vermehrten Komplexen eines Durchmessers von ca. 100 Å (erhöhter Intensitätenanstieg bei $Q = 0,06 \text{ \AA}^{-1}$) bei Zugabe von SP zu einer TatA/TatC-Probe könnte dementsprechend darauf hinweisen, dass ein TatC_d/SP-Komplex nötig ist, um vermehrt TatA zu binden. Über die genaue Zusammensetzung der Komplexe lässt sich jedoch nur spekulieren. Die Ergebnisse bestätigen dennoch eindeutig die Eigenschaft von TatC_d, das Signalpeptid erkennen und binden zu können.

5 Ausblick

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stellt die Membran für den gesamten Tat-abhängigen Transport von prePhoD in *B. subtilis* nicht nur die zu überwindende Barriere dar, sondern fungiert auch als Vermittler für die Interaktion aller Komponenten dieses Systems.

Die Sekundärstrukturaufklärung des Signalpeptids legt eine von den Membranproteinen unabhängige Wechselwirkung mit der Lipiddoppelschicht nahe. Es konnte gezeigt werden, dass die Signalsequenz mit Hilfe einer N-terminal gelegenen amphiphilen α -Helix (S5-K15) den ersten Kontakt zur Membran knüpft. Hierbei setzt sich die Wechselwirkung höchst wahrscheinlich nicht nur aus elektrostatischen Kräften, sondern auch aus einer hydrophoben Wechselwirkung des entsprechenden Bereiches der amphiphilen Helix zusammen. Die hydrophobe Umgebung der Membran induziert hierauf die Ausbildung einer zweiten α -Helix (R26-V49), die aufgrund der vielen hydrophoben Aminosäuren dieses Segments in die Lipidschicht insertieren kann. Zukünftige Festkörper-NMR-Untersuchungen könnten der Bestimmung des exakten Neigungs- und Rotationswinkels der amphiphilen und der hydrophoben Helix in Membranen dienen. Mittels Fragmenten des Proteins, entsprechend der in dieser Arbeit ermittelten Sekundärstrukturelemente, könnten hierbei die einzelnen helikalen Bereiche des Signalpeptids unabhängig voneinander genauer untersucht werden.

Weiterhin lässt der aufgezeigte Knick bei G38 im hydrophoben Bereich des Proteins die Vermutung eines „loop“-Mechanismus zu. In dieser Konformation eingebettet in die Membran kann das Signalpeptid durch laterale Bewegungen den Kontakt mit TatC_d, einem anderen Teil des Translokase-Systems, aufnehmen.

Für TatC_d konnte gezeigt werden, dass es beim Kontakt mit dem Signalpeptid komplexartige Gebilde ausbildet, die den Transport eventuell induzieren. TatC_d bewerkstelligt in diesem minimalen Tat-System wahrscheinlich die Aufgabe eines Bindeglieds zwischen Signalpeptid und der porenausbildenden Membrankomponente TatA_d. Jedoch scheint eine Anlagerung von TatA_d an TatC_d erst dann stattzufinden, wenn TatC_d bereits das Signalpeptid gebunden hat. Hierdurch übernimmt das Protein bei *B. subtilis* nicht nur die Aufgabe von TatC, sondern auch die von TatB, verglichen mit der Tat-Translokase von *E. coli*.

Um die gegenseitige Wechselwirkung von Signalpeptid und TatC_d präziser aufzuklären, könnten auch hier Festkörper-NMR-Experimente in Membranen angewandt werden. Durch selektive Isotopenmarkierung der Einzelkomponenten und geeignete Transfermessungen könnten intermolekulare Berührungspunkte ermittelt und somit ein besseres Verständnis der Kontaktaufnahme des Signalpeptids mit TatC_d erhalten werden.

Des Weiteren konnte für das Membranprotein TatA_d eine genauere Einsicht in den Wechselwirkungsmechanismus mit der Lipiddoppelschicht gewonnen werden. Durch die Beobachtung der Wechselwirkung verschiedener verkürzter TatA_d-Fragmente mit den Lipidkopfgruppen konnten die wesentlichen, an der Membraninteraktion beteiligten Kräfte, herausgestellt werden. Es liegen vermutlich zwei unterschiedliche Prinzipien vor. Einerseits kommt es zu einer elektrostatischen Interaktion des negativ geladenen C-Terminus von TatA_d, der von außen auf die Membranoberfläche einwirkt. Zum anderen wirkt die überwiegend mit positiv geladenen Aminosäuren besetzte amphiphile α -Helix vom Membraninneren auf die negativ geladenen Kopfgruppen ein, da diese amphiphile α -Helix durch den hydrophoben „Membrananker“ in bzw. unter die Kopfgruppen der Lipide gezogen wird. Interessant wäre auch die Dynamik und die Wechselwirkung von der Seite des Proteins statt von der der Lipide aus zu betrachten, z. B. durch Relaxationsmessungen an mit verschiedenen Isotopen markiertem TatA_d.

Die gewonnenen Ergebnisse können dennoch nicht die Frage nach der genauen „Übergabe“ des Signalpeptids durch TatC_d an die TatA_d-Pore klären bzw. was die Porenbildung von TatA_d um einen Signalpeptid/TatC_d-Komplex intiiert. Trotz der fehlenden Einzelheiten, die ein detailliertes Bild des ganzen Mechanismus aufzeigen würden, tragen die Erkenntnisse dieser Arbeit jedoch zu neuen Überlegungen und Strategien bei und geben einen weiteren Teil des Tat-Mosaiks preis.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte mittels verschiedener experimenteller Methoden eine tiefere Einsicht in die Wechselwirkung des Signalpeptids und der porenbildenden Komponente TatA_d mit der Membran, als auch in die Wechselwirkung dieser Proteine mit der zweiten Membrankomponente, TatC_d, der Tat-abhängigen Translokase von PhoD aus *B.subtilis* gewonnen werden. Hierzu konnte das Signalpeptid unmarkiert, ¹⁵N- und ¹⁵N/¹³C- isotopenmarkiert biosynthetisch mittels Überexpression in *E.coli* dargestellt und mit affinitätschromatographischen Verfahren aufgereinigt werden. In CD-spektroskopischen Untersuchungen konnte in verschiedenen membranimitierenden Umgebungen ein α -helikaler Sekundärstrukturanteil von 20-25 % des Signalpeptids ermittelt werden. Mittels orientierter CD-Spektroskopie konnte eine annähernd parallele bzw. eine leicht schräge Orientierung zur Membranoberfläche, die eine amphiphile Helix nahe legt, der α -helikalen Segmente nachgewiesen werden. Um den α -helikalen Bereich ausfindig zu machen, wurden verschiedene Sekundärstruktur-Vorhersagen auf die Aminosäuresequenz angewandt, was die Wahrscheinlichkeit einer Helix im N-terminalen Bereich zwischen S5-K15 und, etwas schwächer, einer weiteren im mittleren hydrophoben Bereich zwischen R26 und V49 aufzeigte. Es konnte weiterhin durch Berechnung des hydrophoben Moments über ein Fenster von 11 Aminosäuren, welches in etwa dem α -helikal ermittelten Anteil der CD-Experimente entsprach, festgestellt werden, dass der größte Wert ebenfalls im Bereich S5-K15 vorzufinden war. Das hydrophobe Moment in diesem Segment des Signalpeptids war somit sehr gut mit den OCD-Daten bzw. der Möglichkeit einer amphiphilen Helix vereinbar. Durch Flüssigkeits-NMR-Experimente konnte unter Auswertung der ¹³C-chemischen Verschiebungen des Rückgrates der α -helikale Bereich S5-K15 verifiziert werden. Es deutete sich jedoch zusätzlich ein zweiter helikaler Bereich in der hydrophoben Domäne des Signalpeptids an, der auch schon in der Auswertung der Vorhersage zu beobachten war (R26-V49). Sowohl in der Vorhersage, als auch im Ergebnis der NMR-Untersuchungen, deutet sich jedoch eine Unterbrechung dieser Helix um G38 an. Mit Hilfe der vorhandenen Daten konnte hieraus ein Model für die ersten Schritte der Membranannäherung des Signalpeptids entwickelt werden.

Festkörper-NMR-Experimente sollten im Weiteren die Wechselwirkung des porenbildenden TatA_d-Moleküls mit der Membran aufzeigen. Hierfür wurde die Wirkung von TatA_d und verschiedenen Konstrukten von TatA_d, entsprechend der bekannten Sekundärstruktur motive des Proteins, auf Kopfgruppen-deuterierte Lipide untersucht. Es konnte anhand der Relaxationszeiten und der unterschiedlichen Quadrupol-Aufspaltungen der beiden CD₂-Gruppen in der Phosphocholin-Gruppe der Lipide ein Model für die Wechselwirkung der einzelnen Segmente des TatA_d-Proteins mit der Membran erstellt werden.

Um die Wechselwirkung der Komponenten untereinander in der Membran zu detektieren, sollten Kleinwinkel-Neutronenstreuungsexperimente der rekonstituierten Proteine in Modelmembranen durchgeführt werden. Es konnte zum einen gezeigt werden, dass TatA_d die Fähigkeit der Selbstassemblierung besitzt. Zum anderen konnte ebenso die Eigenschaft von TatC_d, das Signalpeptid erkennen und binden zu können, bestätigt werden. Desweiteren deuten die SANS-Experimente darauf hin, dass eine verstärkte TatA_d-Assemblierung an TatC_d/Signalpeptid-Komplexen auftritt. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben somit sowohl einen Einblick in die ersten Schritte des Transportvorganges des Tat-Systems von PhoD aus *B.subtilis*, die Signalpeptid-Anlagerung an die Membran, als auch ein tieferes Verständnis der Wechselwirkung des Signalpeptids und der Membrankomponente TatA_d mit der Lipiddoppelschicht. Desweiteren konnte eine Vorstellung vom Wechselspiel der Komponenten in der Membran untereinander gewonnen werden.

7 Material

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Geräte, Materialien und Chemikalien folgender Firmen verwendet.

7.1 Geräte

Autoklav	Varioklav, H + P Labortechnik Sanoclav S-ECZ, Wolf VX-95, Systec 2540 EL, Systec
Brutschrank Einrichtungen	Incucell, MMM Medcenter
CD Spektropolarimeter	J-810, JASCO J-815, JASCO
FPLC	ÄKTApurifier, GE Healthcare GradiFrac, Pharmacia Biotech
Gasbrenner	Schütt flammy S, Schütt Labortechnik
Photo-Print Video-Geldokumentationssystem	21 5-SI, 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 I-6, 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

Neutronenbeugungs-Spektrometer	<i>Large dynamic range small-angle diffractometer D22</i>
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 µl, 2 - 20 µl, 10 - 100 µl, 50 - 200 µl, 100 - 1000 µl	Reference, Eppendorf
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
	ND-1000, NanoDrop®

Vortexer	Genie K-550-GE, Bender und Hobein
Waagen	
Ablesbarkeit 0,1 g	PB 3001, Mettler Toledo
Ablesbarkeit 0,0001 g	A 200 S, Sartorius CP 64, Sartorius
Ablesbarkeit 0,001 mg	M2P, Sartorius
Wasserbad	1008, Gesellschaft für Labortechnik B-480, Büchi Waterbath 006T, LAUDA
Wasserbad Thermostat	U3 - 7A, Julabo A100, LAUDA
Zentrifugen	3-18 K, Sigma Avanti Centrifuge J-25, Beckmann Biofuge fresco, Heraeus Instruments Centrifuge 5415 C, Eppendorf Centrifuge 5417 R, Eppendorf RC 2-B, Sorvall RC 5B Plus, Sorvall L8-M, Beckmann
Zentrifugenrotoren	19776-H, Sigma 50Ti, Beckmann J-Lite JLA-9.1000, Beckmann JA-14, Beckmann SLA-3000 Super-Lite GS-3, Sorvall

7.2 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Rotilabo-Aluminiumfolie, Roth
Autoklavierband	Comply Indicator Tape, 3M
Dialyserschlauch (3.5 kDa MWCO), 10ml	Float-A-Lyser, Spectrum Laboratories
Dialyserschlauch (1 kDa MWCO), 10ml	Float-A-Lyser, Spectrum Laboratories
Dialysemembran (3,5 kDa MWCO)	Spectra/Por 6, Spectrum Laboratories
Einmalspritzen (20 ml, 10ml, 1 ml)	Injekt, B. Braun
Einmalsterilfilter (0,22 µm)	Rotilabo-Spritzenfilter steril, Roth

Einmalsterilfilter (0,45 µm)	Rotilabo-Spritzenfilter unsteril, Roth
Halbmikroküvetten (1 ml)	Sarstedt
Nitrozellulosemembran	PEQLAB
NMR-Gefäß (5 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	Beckmann
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

Acrylamid	Applichem
Agar	Roth
Agarose	PEQLAB
Agarose	Sigma Albumin Fraktion V Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Acros Organic
Ammoniumchlorid	Fluka
Ammoniumchlorid (¹⁵ N-markiert)	Spectra Stable Isotopes
Bactotrypton	Applichem
Benzamidin-Hydrochlorid	Merck
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck

Calciumchlorid	Roth
Chloroform	Roth
Cholinchlorid	AppliChem
Cobaltchlorid	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
D(+)-Biotin	
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem
D-Pantothenat	AppliChem
DMPG	Avanti Polar Lipids
DMPC	Avanti Polar Lipids
D2O	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Roth
Eisen(II)-Sulfat	Fluka
Ethanol	Merck
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
Tris	AppliChem
Tris-Hydrochlorid	Roth
Trypton	Roth
Zinksulfat	AppliChem

7.4 Protein Marker

PageRuler Protein Ladder

Fermentas

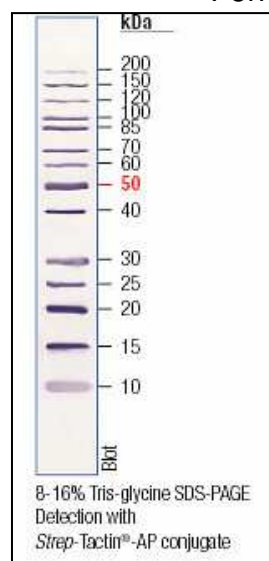


Abbildung 36: PageRuler Protein Ladder

7.5 Kits für die Molekularbiologie

E.Z.N.A Plasmid Minprep I

PeqLab

QIAfilter Midi Kit

Qiagen

7.6 Affinitätschromatographiesäulchen

HisTrap FF 5 ml (Ni²⁺-NTA)

Amersham Biosciences

HisTrap Benzamidine FF 1 mL

Amersham Biosciences

7.7 Enzyme

Benzonase

Merck

Lysozym

Applichem

7.8 Vektoren

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

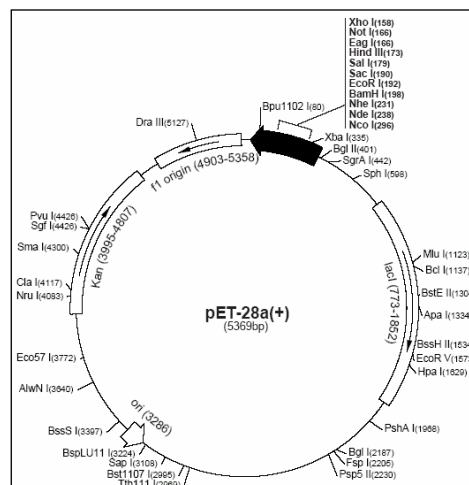


Abbildung 37: Expressionsvektor pET-28a(+)

7.9 Bakterienstämme

<i>Escherichia Coli BL21(DE3)</i>	<i>Novagen</i>
<i>Escherichia Coli XL1-Blue</i>	Stratagene
<i>Escherichia Coli DH5α</i>	Invitrogen

7.10 Expressionsstämme

*Escherichia Coli BL21(DE3)pET28a(+)***SP-His** Marco Jan Klein, Universität Karlsruhe

7.11 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

7.11.1 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

LB-Medium (1 Liter):	10 g Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 1 l bidest. H ₂ O zugeben, pH = 7,5 einstellen, autoklavieren
M9-Salz-Lösung	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 1 l bidest H ₂ O zugeben, 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 0,08 g CoCl ₂ ·6H ₂ O 0,07 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0,03 g CuCl ₂ ·2H ₂ O 2 mg H ₃ BO ₃

	0,5 g EDTA in 100 ml bidest. H ₂ O auflösen, steril filtrieren, bei 4°C lagern
Vitaminmix	10 mg Biotin 10 mg Cholinchlorid 10 mg Folsäure 10 mg Niacinamid 10 mg D-Pantothenat 10 mg Pyridoxal 1 mg Riboflavin in 100 ml bidest. H ₂ O auflösen, steril filtrieren, bei 4°C lagern
MgCl ₂ (1M)	20,33 g MgCl ₂ ·6H ₂ O in 100 ml bidest. H ₂ O auflösen, steril filtrieren, bei 4°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)	50 mg Kanamycin 1 ml dest. H ₂ O steril filtrieren, bei – 20°C lagern
SOC-Medium (1 Liter)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl autoklavieren, nach Abkühlen
zugeben:	10 ml MgCl ₂ (1 M)

	10 ml MgSO ₄ (1 M) 10 ml Glucose (2 M), steril filtrieren
IPTG-Lösung (200 mM)	47,6 mg IPTG/ml dest. H ₂ O Steril filtrieren, bei – 20°C lagern
Glucose (20%)	10 g Glucose auf 50 ml mit H ₂ O bidest. 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)	4,8 mg Pefabloc mit bidest. H ₂ O auf 1 ml auffüllen bei - 20°C lagern
Benzamidin-Lösung (478,8 mM)	75 mg Benzamidin-Hydrochlorid mit bidest. H ₂ O auf 1 ml auffüllen
TSS-Lösung	42,5 ml LB-Medium 5 g PEG 2,5 ml DMSO 2, 5 ml MgSO ₄ (1 M) pH = 6,5 einstellen

7.11.2 Puffer und Lösungen für die SDS-Page

Anodenpuffer	121,1 g Tris 5 l dest. H ₂ O pH = 8,9 einstellen
Kathodenpuffer	12,11 g Tris 17,92 g Tricin

	1 g SDS 1 l dest. H ₂ O
4x Tris-HCl-Lösung	6,05 g Tris 100 ml H ₂ O pH = 6,8 mit HCl (1M) einstellen, sterilfiltrieren (0,45 µm Membran) 0,4 g SDS
Tris-Cl-Lösung	182 g Tris 500 ml H ₂ O pH = 8,45 mit HCl (1M) einstellen, sterilfiltrieren (0,45 µm Membran) 1,5 g SDS
2x SDS-PAGE Probenpuffer	1,75 ml 1 M Tris-Base, pH = 6,8 1,5 ml Glycerin 5 ml SDS (10%) 0,24 g DTT 1 kl. Spatelspitze Bromphenolblau auf 10 ml mit dest. H ₂ O auffüllen bei 4°C lagern
Färbe-Lösung	250 mg Coomassie G-250 50 ml Essigsäure 450 ml Ethanol 1000 ml dest. H ₂ O
Fixier-Lösung	500 ml Ethanol 100 ml Essigsäure auf 1000 ml mit dest. H ₂ O auffüllen

steril filtrieren und entgasen
im Ultraschallbad unter vermindertem
Druck entgasen (20 min)

7.12 Software

HeliQuest

www.expasy.org

PEPTIDEMASS

www.expasy.org

ProtParam

www.expasy.org

ProtScale

www.expasy.org

Jpred3

www.expasy.org

ND-1000 V3.3.0

NanoDrop®

8 Methoden

8.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

8.1.1 Steriltechnik

Um sterile Bedingungen bei entsprechenden Arbeitsschritten zu gewährleisten, werden diese unter der Reinraumbank durchgeführt. Zur Sterilisation werden Glasgeräte mit Alufolie bedeckt und für 3 h bei 200 °C in den Trockenschrank gestellt. Benötigte Materialien wie Kunststoffpipettenspitzen und auch Lösungen werden bei einer Temperatur von 121 °C und einem Wasserdampfüberdruck von 1 bar für 20 min autoklaviert. Ein Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm wird für hitzeempfindliche Lösungen verwendet. Bei Entnahme einer Lösung wird die Öffnung des Behältnisses zuvor mit einem Busenbrenner abgeflammt.

8.1.2 Ansetzen einer Übernachtskultur

20 ml LB-Medium, 200 µl Glucose-Lösung (20%) und das entsprechende Antibiotikum in der jeweiligen Konzentration werden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Angeimpft wird durch Zugabe einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte, die mit Hilfe einer ausgeglühten Drahtöse von einer Agarplatte entnommen wird. Die Übernachtskultur wird in einem Schüttler bei 37 °C und einer Rotationsgeschwindigkeit von 200 rpm über Nacht inkubiert.

8.1.3 Ansetzen einer Glycerinkultur

500 µl Zellkultur aus einer Übernachtskultur werden mit 500 µl einer sterilen 50%igen Glycerinlösung in einem Kryoröhrchen gemischt und bei -80 °C gelagert.

8.1.4 Herstellung von Agarplatten

500 ml LB-Medium werden mit 8 g Agar versetzt und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Lösung wird autoklaviert und nach dem Abkühlen auf ca. 40 °C wird das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Lösung wird nun gleichmäßig unter der Reinraumbank auf Petrischalen verteilt.

8.1.5 Ausstrich aus einer Glycerinkultur

Mit Hilfe einer ausgeglühten Impföse wird etwas Zellkultur aus dem Glycerinstock entnommen und auf einer Agar-Platte fein verteilt ausgestrichen. Die Agar-Platten werden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

8.2 Genetische Arbeitsmethoden

8.2.1 Plasmid-DNA Isolierung

Zur Durchführung einer Plasmidisolierung wird das E.Z.N.A Plasmid Miniprep I Kit der Firma PEQLAB verwendet. 4 ml der Übernachtskultur werden entnommen und in zwei Eppendorfgefäße gleichmäßig verteilt. Die Zellen werden bei 10.000 rpm für eine Minute abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Nach der Resuspension der Bakterienpellets in 250 µl RNase-haltiger Lösung I werden 250 µl Lösung II zugegeben. Sechsmaliges Invertieren des Gefäßes sorgt für eine Durchmischung der beiden Lösungen und somit zu einem Aufschluss der Zellen. Das nach zweiminütiger Inkubationszeit gebildete klare Lysat wird durch Zugabe von 350 µl Lösung III neutralisiert. Mehrmaliges Invertieren führt zur Präzipitation denaturierter Proteine, welche mittels einer Zentrifuge bei 10.000 rpm für 10 Minuten sedimentiert werden. Der klare Überstand wird auf eine HiBind-Miniprep-Zentrifugensäule aufgetragen und für 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird in einem 2 ml Sammel-Gefäß aufgefangen und verworfen, während die Plasmid-DNA auf der Säule bindet. Die Rohplasmid-DNA wird mit 500 µl HB-Puffer gewaschen, um noch vorhandene Proteinkontaminationen zu beseitigen. Es folgt zweimaliges waschen mit jeweils 750 µl DNA-Waschpuffer. Alle Puffer werden jeweils durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm entfernt. Eine zusätzliche Zentrifugation nach den Reinigungsschritten trocknet die Säule. Eluiert wird mit 50 µL Elutionspuffer oder 50 µL bidest. H₂O in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß. Hierzu wird erneut für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA von der Säule gewaschen wird.

8.2.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wird von der Firma MWG-Biotech durchgeführt. Hierzu werden 15 µL aus der Plasmidisolierung erhaltenen Plasmid-DNA-Lösung an die Firma MWG-Biotech geschickt.

8.2.3 Darstellung hitzekompetenter Zellen

Es wird eine Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstamms angesetzt. Die gewachsenen Zellen werden am nächsten Tag mit LB-Medium im Verhältnis 1:100 versetzt und im Schüttelinkubator bis zu einer optische Dichte (OD_{600}) von 0,2 bis 0,3 AU weiter inkubiert. Die folgenden Schritte werden alle auf Eis durchgeführt. Die Bakterien werden bei 3.300 rpm für 20 min abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert und Aliquote zu je 100 µL in Eppendorfgefäße gefüllt. Diese werden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 80°C gelagert.

8.2.4 Hitzetransformation

Unter der Reinraumbank werden 5 µL des Plasmids zu je 100 µL hitzekompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 s wird die Lösung wieder kurzzeitig auf Eis gestellt. Anschließend wird 1 mL SOC-Medium hinzugegeben und für eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend werden jeweils 500 µL der Zellsuspension auf einer Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Nach einer Nacht bei 37°C im Brutschrank sind bei erfolgreicher Transformation Kolonien auf der Agar-Platte gewachsen.

8.3 Proteinchemische Methoden

8.3.1 Expression

Zu Beginn einer Expression wird eine Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstamms angesetzt. Mit je 5 mL von dieser werden am nächsten Tag vier 2 L Kolben mit jeweils 500 mL Kulturmedium und dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Nachdem sich die Bakterien in einem Schüttelinkubator bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,4-0,6 AU vermehrt haben, wird die Expression durch Zugabe von jeweils 1,25 mL IPTG (200 mM) gestartet. Um das Wachstum der Zellen zu überprüfen wird stündlich eine Probe entnommen, deren OD_{600} mit einer Verdünnung 1:10 gemessen wird. Die abzentrifugierten Zellen dieser Proben werden zur Überprüfung mittels SDS-Gelelektrophorese bei -20°C gelagert. Unmarkiertes Probenmaterial wird durch Verwendung von LB-Medium erreicht, zur uniformen Isotopenmarkierung jedoch wird ein definiertes Kulturmedium (siehe Tab. 6) verwendet, welches im Fall einer ^{15}N -Markierung $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ und entsprechend bei einer ^{13}C -Markierung nur ^{13}C - α -D-Glucose als einzige Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle enthält.

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
Kan50	1 ml

Tabelle 6: Zusammensetzung M9-Minimalmedium für Isotopenmarkierung

8.3.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Nach erfolgter Expression werden die Zellen abzentrifugiert und in ca. 25 mL HisTrap Binding-Puffer resuspendiert. Pro 10 mL Zelllösung werden nun 100 µl Pefabloc (20 mM), 100 µl Benzamidin (478,8 mM), 100 µl PMSF (100 mM) als Proteaseinhibitoren und 5 µl Benzonase zum Schneiden vorhandener DNA zugesetzt. Zur Unterstützung des Zellaufschlusses mittels Ultraschall wird der Lösung zusätzlich noch Lysozym (50 µg/mL) hinzugefügt. Um ein starkes Erhitzen der Zellsuspension zu vermeiden, wird in Intervallen von jeweils drei Minuten mit einem Ultraschallfinger bei 65 % Leistung und unter ständiger Eiskühlung sonifiziert. Ein Aufklären der Bakterienlösung zeigt das Ende eines erfolgreichen Zellaufschlusses.

8.3.3 Lokalisation des Proteins

Durch eine Zentrifugation bei 5.000 rpm der Aufschlusslösung werden eventuell gebildete inclusion bodies und die Zelltrümmer als Pellet vom Rest der Lösung abgetrennt. Dieses wird in einem weiteren Schritt in HisTrap Binding-Puffer mit 2 % NLS solubilisiert. Vom Überstand werden mittels einer Ultrazentrifugation bei 40.000 rpm die Membranen abgetrennt. Auch das Membranpellet wird in HisTrap Binding Puffer mit 2 % NLS solubilisiert. Der nun vorhandene Zellplasmaüberstand enthält die noch vorhandenen löslichen Proteine. Aus allen drei Fraktionen wird Material für eine SDS-Page zur Lokalisierung des exprimierten Proteins entnommen.

8.3.4 Dialyse

Vor der Thrombinspaltung und als letzter Schritt der Aufreinigung wird das Protein dialysiert, um das Detergenz sowie die Puffersubstanzen zu entfernen. Es wird ein Spectra/Por 6 Dialyseschlauch mit entsprechendem MWCO mit der Proteinlösung befüllt und diese für ein bis zwei Wochen gegen 5 L bidestilliertes Wasser unter mehrmaligem H₂O-Austausch dialysiert. Die Proteine fällen als ein weißer flockiger Feststoff aus und können anschließend durch Zentrifugation gewonnen werden.

8.3.5 Thrombinspaltung

Zur Thrombinspaltung werden ca. 5 mg lyophilisiertes Protein mit 10 mL 2 % NLS solubilisiert und mit 300 µL Thrombin (ca. 225 U) versetzt. Die Spaltung vollzieht sich über 24 h bei Raumtemperatur. Zur Entfernung des Thrombins aus der Lösung wird der Ni²⁺-Affinitätssäule eine HisTrap-Benzamidin-Säule (1 mL) vorgeschaltet.

8.4 Chromatographische Methoden

8.4.1 Nickel-Affinitätschromatographie

Durch einen C-terminalen Hexahistidin-Tag (His-Tag) ist es möglich das Protein, das als Fusionsprotein mit diesem exprimiert wird, durch eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographiesäule aufzureinigen. Die zugrundeliegende Funktionsweise dieser Chromatographie ist die Bindung der Histidine an die immobilisierten Ni²⁺-Ionen. Elution erfolgt durch eine Erhöhung der Imidazol-Konzentration in der Pufferlösung. Das freie Imidazol konkurriert hierbei mit dem aufzureinigenden Protein um die selektiven Bindungsstellen. Es wird ein ÄKTApurifier Chromatographiesystem wie vom Hersteller beschrieben zur Aufreinigung mittels einer HisTrap FF Affinitätschromatographiesäule verwendet. Vorbereitende Schritte sind das Sterilfiltrieren und die Entgasung der verwendeten Lösungen. Die Flussrate der Auftragung und der Elution beträgt 5 mL/min. Zur Regeneration der Säule wird diese durch einen Spülvorgang mit 5-10 Säulenvolumen Stripping-Puffer „gestrippt“. EDTA komplexiert dabei die Nickel-Ionen, die somit von der Säule gewaschen werden können. Vor der Neubeladung mittels einer 0,1 M NiSO₄-Lösung wird die Säule mit 5-10 Säulenvolumen Binding-Puffer und mit 5-10 Säulenvolumen bidest. H₂O gespült. Nach der Regeneration wird die Säule abermals mit 5 Säulenvolumen bidest. H₂O und 10 Säulenvolumen Binding-Puffer gespült. Alle verwendeten Puffer werden zusätzlich mit 0,1 % NLS versetzt, um ein Präzipitieren des nicht löslichen Proteins auf der Säule zu verhindern. Vor dem Auftragen werden alle Fraktionen für 30 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert, um ein Verstopfen der Säule durch unlösliche Bestandteile zu vermeiden. Die Proben werden über eine Probenschleife, eine sogenannte *superloop*, aufgetragen. Durch Detektion mittels eines Photometers bei 280 nm oder durch eine Leitfähigkeitsmessung kann das Auftragen und die Elution

verfolgt werden. Aufgetragen mit Binding-Puffer wird solange bis die Absorption wieder den Wert Null erreicht. Bei der Elution werden Fraktionen von einer Größe von 10 mL gesammelt. Alle Proteine, die nicht an die Säule gebunden haben, befinden sich nach dem Auftragen in der Durchflussfraktion. Um eine unspezifische Bindung anderer Proteine zu umgehen, wird der Binding-Puffer mit 20 mM Imidazol versetzt. Durch eine subtraktive Ni²⁺-Affinitätschromatographie wird das Protein nach der Thrombinspaltung aufgereinigt, indem das ungespaltene Protein sowie der abgespaltene His-Tag an die Säule binden, das gespaltene Protein ohne His-Tag jedoch im Durchfluss zu finden ist. Die Säule wird nach ihrer Reinigung in 20 %igem Ethanol gelagert.

8.5 Analytik

8.5.1 UV-Quantifizierung

Um eine Mengenbestimmung bei Plasmiden durchzuführen muss eine UV-Licht durchlässige Küvette verwendet werden, da dies bei einer UV-Absorption von 260 nm vollzogen wird. Eine Absorption bei 260 nm von 1,0 ergibt sich, wenn die Küvette eine Schichtdicke von 1 cm besitzt und eine Probenkonzentration von 50 µg/mL vorliegt, da sich die Plasmidkonzentration wie folgt berechnet:

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

Der Nullabgleich wird bei dem verwendeten Programm DNA/RNA im Photometer durch die Plasmid-freie Pufferlösung realisiert. Die Messung der zweiten Wellenlänge bei 280 nm dient der Abschätzung der Reinheit der DNA aufgrund des Absorptionsmaximums von Proteinen bei dieser Wellenlänge. Der Quotient aus A_{260} und A_{280} ist ein Maß für die Reinheit des Plasmids und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

8.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Um den Proteingehalt und die Reinheit der Proteinproben zu überprüfen, wird eine SDS-Page durchgeführt. Die für die Elektrophorese verwendete Probenkammer ist die Mini-Protean Tetra Cell Kammer der Firma Bio-Rad. Es wird auf einem 16 % Tris-Tricin-Gel aufgetrennt, das sich wie in Tabelle 7 zusammensetzt.

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-
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

Tabelle 7: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE

Die Polymerisation wird durch abschließende Zugabe des Radikalstarters APS gestartet. Um eine glatte Oberfläche des Trenngels zu erreichen, wird dieses sofort nach der Zugabe von APS zwischen zwei Glasplatten pipettiert und mit ca. 1 mL H₂O überschichtet. Nach der Aushärtung des Trenngels wird das Wasser abgegossen, das polymerisierende Sammelgel darauf gegeben und mit einem Probenkamm versehen, der zur Ausbildung von Probenaschen verwendet wird. Die aufzutragenden Proben werden mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt, wobei sich dessen Menge für die Expressionsreihen folgendermaßen errechnet:

$$\frac{OD_{600}}{0.2} \times 7.5 = x \mu\text{L} \quad 2 \times \text{SDS - Ladepuffer}$$

Die Proben werden vor dem Auftragen für 5 min im Wasserbad bei 95°C erhitzt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wird zusätzlich eine Probenasche mit einem Proteinmarker beladen. Anschließend wird das Gel in die Probenkammer eingesetzt und diese mit Anoden- und Kathodenpuffer befüllt. Die elektrophoretische Trennung

erfolgt bei konstanter Stromstärke von 40 mA, was unter diesen Bedingungen einer Anfangsspannung von ca. 100 V entspricht. Aufgabe der SDS-Moleküle ist es die Proteine zu denaturieren und sie gleichmäßig mit negativer Ladung auszustatten. Dies führt zu einer Proportionalität zwischen der Wanderungsstrecke und der Größe des Proteins. Kleine Moleküle werden hierdurch durch das engmaschige Polyacrylamid-Gel weniger aufgehalten und passieren es schneller. Erreicht der blaue Farbstoff (Bromphenolblau) des Ladepuffers die Unterkante des Gels, wird die Elektrophorese beendet. Zur Färbung des Trenngels wird zunächst das Sammelgel entfernt. Einer zehnmütigen Behandlung in Fixierlösung und der Färbung für 60 min in einer Coomassie-Lösung folgt eine Entfärbung in Entfärber-Lösung. Sobald die Proteinbanden sichtbar werden, kann das Gel fotografiert und ausgewertet werden.

8.5.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Eine kleine, gerade sichtbare Menge der gewünschten Probe wird in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Messung eines MALDI-TOF-Massenspektrums (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight*) werden 5 µl der Matrix-Lösung (gesättigte 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Acetonitril/Wasser (1:2) mit 0,1 % TFA) zur Probe hinzugeben und für 5 min bei 4.000 rpm zentrifugiert. 1 µL der Probe wird verwendet, um diesen auf eine MALDI-Proben Platte (Target) aufzutragen und die darin enthaltene Probe mit der Matrix durch Trocknung zu kokristallisieren. Die Messung dient unter anderem der Bestimmung des Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z -Verhältnis) eines Analyts. Die Ionisierung bei der MALDI-Methode ist für Proteine geeignet, da diese sehr schonend ist. Durch Einwirkung eines Laserstrahls verdampfen die Matrixmoleküle und die Moleküle der eigentlichen Probe werden ohne eine Fraktionierung desorbiert und ionisiert. Nun wird die Flugzeit des in einem elektrischen Feld im Hochvakuum beschleunigten ionisierten Analyten gemessen. Da eine Proportionalität zwischen der Flugzeit und dem Masse/Ladungs-Verhältnis besteht, kann somit die Masse des Analyts bestimmt werden. Die nötigen Messungen für diese Arbeit wurden von Dr. Sergii Afonin (KIT Karlsruhe) an einem MALDI-TOF-Massenspektrometer der Firma Bruker durchgeführt.

8.5.4 CD-Spektroskopie

Um bei der CD-Messung möglichst natürliche Gegebenheiten zu erzielen, wird das Protein in eine membranimitierende Umgebung eingebracht. Dies kann durch verschiedene Systeme, wie z.B. Einbringen des Proteins in Detergenzmizellen oder Lipidvesikel, erreicht werden. Zur Rekonstitution in Mizellen werden 0,1 mg des Proteins direkt in einer SDS-Lösung bei einem Protein/Detergenz-Verhältnis von 1:200 (mol/mol) gelöst und anschließend mit Ultraschall behandelt. Zur Rekonstitution in Lipidvesikeln wird das Protein und die Lipide in detergentzhaltiger Lösung kosolubilisiert. Bildung der Lipidvesikel erfolgt durch langsames Entfernen des Detergenzes (NLS) mittels BioBeads. Die Lösung wird hierzu unter ständigem Rühren bei 35°C stündlich mit einer weiteren Spatelspitze BioBeads versetzt. Vor dem Einsatz der BioBeads müssen diese mit Methanol und anschließend mehrmals mit bidestilliertem Wasser gewaschen werden. Nach vier Stunden wird die Lösung durch mit H₂O gewaschene Glaswolle filtriert. Die hierdurch erhaltenen Multi Lamellar Vesicles (MLV's) bilden durch Behandlung mit Ultraschall Small Unilamellar Vesicles (SUV's). Das Protein/Lipid-Verhältnis liegt bei den Vesikelproben zwischen 1:25 und 1:100 (mol/mol), wobei eine Proteinmenge zwischen 0,0125 mg und 0,05 mg pro Probe eingesetzt wird. Die Mizellenproben werden bei einer Temperatur von 20°C gemessen. Im Fall der Vesikelproben wird eine Temperatur über dem Phasenübergang des entsprechenden Lipids gewählt, um die Messung in der flüssig-kristallinen Phase durchzuführen. Zur CD-Messung wird eine 250 µL Quarzglasküvette mit 1 mm Schichtdicke verwendet. Die Aufnahme erfolgt bei 30 °C in einem Jasco J-810 Spektropolarimeter von 260-180 nm in 0,1 nm Intervallen. Das Ergebnis ist ein Mittel aus drei Messungen, die je mit einer Scangeschwindigkeit von 10 nm/min, 4 s response time und einer 1 nm Bandbreite aufgenommen werden. Ein Spektrum der reinen Matrix ohne Protein dient als Referenzspektrum. Zur Glättung der Spektren und zur Basislinienkorrektur (Elliptizität bei 260 nm beträgt null) wird die Spectra Analysis Software von Jasco verwendet. Mit Hilfe der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan in der Sequenz des Proteins kann eine UV-Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden und somit die mean residue ellipticity berechnet werden. Die einzelnen Sekundärstrukturanteile des gemessenen Proteins werden durch Anwendung der Algorithmen CONTIN-LL und CDSSTR, die auf dem DICHROWEB-Server der Universität Birbeck, London zur Verfügung stehen, bestimmt. Die Übereinstimmung des zurückberechneten Spektrums mit dem

experimentellen Spektrums, die mit dem Sekundärstrukturanteil korreliert, kann über die normalized-rootmean-square deviation (NRMSD) bestimmt werden, wobei ein Wert <0.1 für eine gute Übereinkunft steht.

8.5.5 Orientierte CD-Spektroskopie

Eine OCD-Messung erfordert die Rekonstitution des Proteins in orientierten Lipiddoppelschichten. Die Vesikellösungen werden in gleicher Weise wie bei der Probenvorbereitung für eine CD-Messung hergestellt. 80 μL einer Vesikellösung, die ca. 20 μg an Protein und 0,2 mg Lipid enthält, wird auf einen Quarzglasprobenträger mit 20 mm Durchmesser (Suprasil QS, Hellma Optik, Jena) aufgebracht. Der Durchmesser des Tropfens bzw. der aufgetragenen Probenfläche sollte ca. 10 mm betragen. Die Probe wird unter leichtem Luftstrom getrocknet und anschließend in die OCD-Messzelle eingebaut. In dieser wird sie über Nacht bei einer relativen Luftfeuchte von 97 % (gesättigte K_2SO_4 -Lsg., $T=304\text{ K}$) rehydratisiert. Die OCD-Messzelle wird in das Jasco J-810 Spektropolarimeter eingebracht und durch Rotation der OCD-Probenkammer senkrecht zum Lichtstrahl um jeweils 45° wird die Probe in den entsprechenden acht verschiedenen Winkeln gemessen. Die Spektren werden nun gemittelt, um mögliche spektrale Artefakte, die durch Lineardichroismus und Doppelbrechung entstehen können, abzuschwächen. Ebenso wie bei der CD-Spektroskopie wird eine Lipid-Referenzprobe hergestellt, deren Spektrum als Hintergrund abgezogen wird.

8.5.6 Flüssigkeits-NMR Spektroskopie

Zur Herstellung einer Flüssigkeits-NMR Probe wird das Protein in Detergenz-Mizellen rekonstituiert. Hierzu werden 1 mM des lyophilisierten Proteins und 450 mM SDS-d₂₅ in 450 μL 0,5 M NaPi (pH = 6,6) mittels Ultrachall gelöst und anschließend 50 μL D₂O hinzugefügt. Die fertig gelöste Probe wird in ein 5 mm Probenröhrchen pipettiert. Die Messungen wurden von Dr. Claudia Muhle-Goll (KIT Karlsruhe) an einem Bruker Avance 600 MHz Spektrometer mit einem TBI-Tripelresonanz Probenkopf durchgeführt. Nach der Optimierung der Feldhomogenität wird die Einstrahlfrequenz der Protonen auf die Wasserlinie gesetzt. Diese wird hierdurch unterdrückt und im Anschluss werden die Pulslängen der entsprechenden Kerne bestimmt. 3D Tripelresonanzexperimente (HNCA, CBCANH und CBCA(CO)NH)

werden bei einer Temperatur von 35°C aufgenommen und ermöglichen die Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen des gemessenen Proteins. Zur Abschätzung von Wasserkontakten und zur Bestimmung der intramolekularen NOE-Kontakte wird ein ^{13}C gefiltertes, ^{15}N -editiertes NOESY-Experiment bei 37°C durchgeführt. Die Referenzierung der Spektren erfolgt mittels DSS. Es wird das Programm NMRPIPE zum Prozessieren verwendet und NMRVIEW dient der Auswertung der Spektren.

8.5.7 Festkörper-NMR Spektroskopie

Zur Messung einer Festkörper-NMR Probe wird das Protein wie in 8.5.4 beschrieben in Lipidvesikeln rekonstituiert. Nach der Filtration über Glaswolle wird ein pH-Wert von 7,0 eingestellt. Durch wiederholtes Einfrieren und Erwärmen (*freeze & thaw*) wird ein mehrmaliger Wechsel zwischen der Gelphase und der flüssig-kristallinen Phase der Lipide erreicht. Dies führt zur Ausbildung von vielschichtigen und größeren MLVs, die zu einer Trübung der Lösung führen. Die Protein-Lipidvesikel werden zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. In einem nächsten Schritt werden die Vesikel lyophilisiert und mit einer definierten Menge an bidestilliertem Wasser (ca. 15 μL) aufgenommen. Durch anschließendes Einfrieren und Erwärmen wird erneut ein mehrmaliger Wechsel des Phasenübergangs erzielt. Die Vesikelsuspension wird zur Messung in 2,5 mm Kelf-Probenröhrchen überführt. Die Festkörper-NMR Messungen erfolgten an einem 600 MHz Avance Spektrometer der Firma Bruker mit einem Doppelresonanz-Probenkopf mit einer 5 mm Rundspule. ^{31}P -NMR Spektren werden mittels einer ^1H entkoppelten Hahn-Echo-Pulssequenz zur Kontrolle der Qualität der jeweiligen Probe aufgenommen (siehe Abb. 38). Zur Messung der ^2H -Spektren wird ein Quadrupol-Echo-Pulsprogramm verwendet. Im Fall der T_1 -Relaxationszeit wird eine *inversion recovery* -Pulssequenz mit Interpulsintervallen zwischen 10 μs und 2s und im Fall der T_2 -Relaxationszeit eine Quadrupol-Echo-Pulssequenz mit Interpulsintervallen von 20 μs bis 4 ms verwendet. Das Intervall zwischen den Pulsen bei Beobachtung der unterschiedlichen Aufspaltungen beträgt 30 μs . Zur Auswertung und Visualisierung der Daten wird die Software Topspin (Bruker Biospin) eingesetzt.

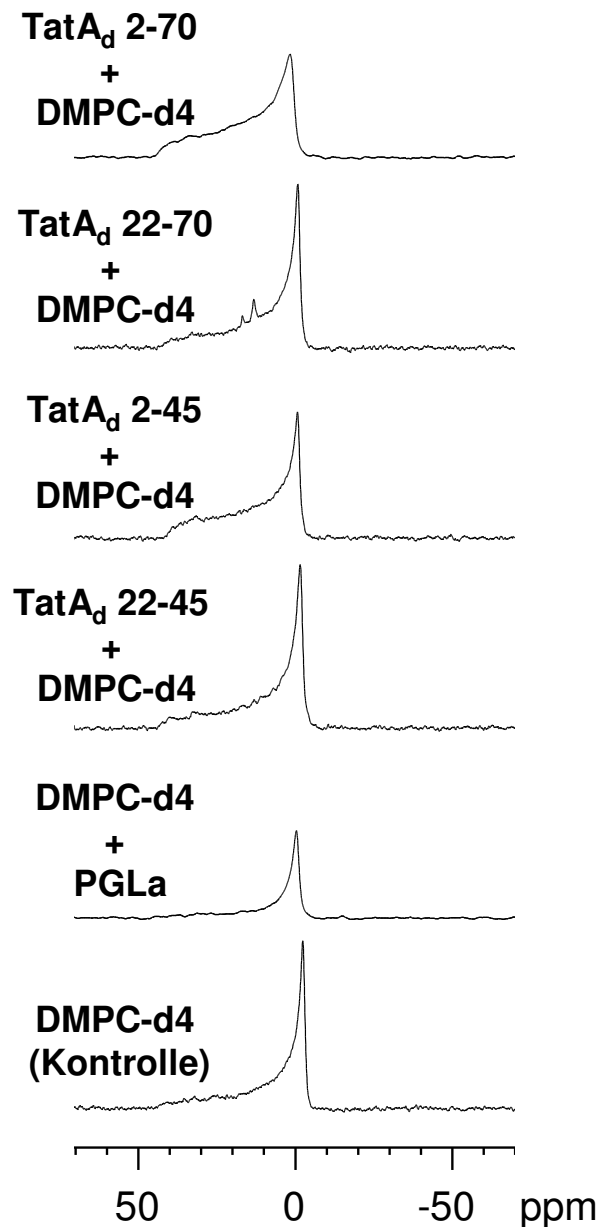


Abbildung 38: ^{31}P -NMR-Spektren von reinem DMPC-d4 (Kontrolle), mit PGLa, mit TatA_d 22-45, TatA_d 2-45, TatA_d 22-70, TatA_d 2-70

8.5.8 Neutronenbeugungsexperimente

Die Kleinwinkel-Neutronenbeugungsexperimente werden in einem q -Bereich von 0,02 bis 0,4 \AA^{-1} durchgeführt. Die Neutronen werden zur Detektion der jeweiligen Intensität des Streuobjekts mit einer Wellenlänge von $\lambda = 6 \text{ \AA}$ ($\pm 10\%$ FWHM) eingestrahlt. Die Kollimations- und Detektorabstände betragen jeweils 17,6 m und 2,8 m. Die Formel für den Impulsübertrag lautet $Q = 4\pi \sin(\theta) / \lambda$. Der Streuwinkel ist definiert als 2θ . Die Proteine werden in DMPC-Lipiddoppelschichten zwischen achtzehn $9 \times 12 \text{ mm}^2$ Glasplättchen mittels einer Vorbehandlung durch Biobeads

rekonstituiert (siehe 8.5.4) Die Glasplättchen werden in eine Quarzküvette mit 2 mm Schichtdicke gesetzt. Pro Glasplättchen werden ca. 1,2 mg Lipid aufgetragen. Das P/L-Verhältnis liegt zwischen 1:75 und 1:100. Die SANS-Experimente wurden auf dem High-Flux-Instrument D22 am ILL, Grenoble durchgeführt.

9 Literaturverzeichnis

- (1) Stryer, L.; Tasker, R.; Rhodes, C. *Biochemistry*; W. H. Freeman, 2000.
- (2) Gressner, A. M. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*; Springer-Verlag GmbH, 2011.
- (3) Müller-Esterl, W.; Plenikowski, M. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*; Spektrum-Akademischer Vlg, 2009.
- (4) Müller, J. P. *Biospektrum* **2002**, 4/02 8.Jahrgang, 360.
- (5) Fekkes, P.; Driessen, A. J. *Microbiol Mol Biol Rev* **1999**, 63, 161.
- (6) Gunkel, K.; Veenhuis, M.; van der Klei, I. J. *FEMS Yeast Research* **2005**, 5, 1037.
- (7) Driessen, A. J. M.; Nouwen, N. **2008**.
- (8) Mould, R. M.; Robinson, C. *J Biol Chem* **1991**, 266, 12189.
- (9) Müller, J. P. *Bioforum* **2003**, 4, 197.
- (10) Berks, B. C.; Sargent, F.; Palmer, T. *Mol Microbiol* **2000**, 35, 260.
- (11) Widdick, D. A.; Eijlander, R. T.; van Dijl, J. M.; Kuipers, O. P.; Palmer, T. *J Mol Biol* **2008**, 375, 595.
- (12) Pop, O.; Martin, U.; Abel, C.; Müller, J. P. *J Biol Chem* **2002**, 277, 3268.
- (13) Robinson, C.; Bolhuis, A. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, 2, 350.
- (14) Santini, C. L.; Bernadac, A.; Zhang, M.; Chanal, A.; Ize, B.; Blanco, C.; Wu, L. F. *J Biol Chem* **2001**, 276, 8159.
- (15) Sanders, C.; Wethkamp, N.; Lill, H. *Mol Microbiol* **2001**, 41, 241.
- (16) Palmer, T.; Berks, B. C. *Microbiology* **2003**, 149, 547.
- (17) Bogsch, E. G.; Sargent, F.; Stanley, N. R.; Berks, B. C.; Robinson, C.; Palmer, T. *J Biol Chem* **1998**, 273, 18003.
- (18) Berks, B. C.; Palmer, T.; Sargent, F. *Curr Opin Microbiol* **2005**, 8, 174.
- (19) Bachmann, J.; Bauer, B.; Zwicker, K.; Ludwig, B.; Anderka, O. *FEBS J* **2006**, 273, 4817.
- (20) De Buck, E.; Vranckx, L.; Meyen, E.; Maes, L.; Vandersmissen, L.; Anne, J.; Lammertyn, E. *FEBS Lett* **2007**, 581, 259.
- (21) Stanley, N. R.; Findlay, K.; Berks, B. C.; Palmer, T. *J Bacteriol* **2001**, 183, 139.
- (22) Ize, B.; Stanley, N. R.; Buchanan, G.; Palmer, T. *Mol Microbiol* **2003**, 48, 1183.
- (23) Bernhardt, T. G.; Boer, P. A. J. d. *Mol Microbiol* **2003**, 48, 1171.
- (24) Ochsner, U. A.; Snyder, A.; Vasil, A. I.; Vasil, M. L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, 8312.
- (25) Zhang, L.; Zhu, Z.; Jing, H.; Zhang, J.; Xiong, Y.; Yan, M.; Gao, S.; Wu, L. F.; Xu, J.; Kan, B. *BMC Microbiol* **2009**, 9, 114.
- (26) Dilks, K.; Gimenez, M. I.; Pohlschröder, M. *J Bacteriol* **2005**, 187, 8104.
- (27) Hutcheon, G. W.; Bolhuis, A. *Biochem Soc Trans* **2003**, 31, 686.
- (28) Bolhuis, A. *Microbiology* **2002**, 148, 3335.
- (29) Rose, R. W.; Brüser, T.; Kissinger, J. C.; Pohlschröder, M. *Mol Microbiol* **2002**, 45, 943.
- (30) Summer, E. J.; Mori, H.; Settles, A. M.; Cline, K. *J Biol Chem* **2000**, 275, 23483.
- (31) Walker, M. B.; Roy, L. M.; Coleman, E.; Voelker, R.; Barkan, A. *J Cell Biol* **1999**, 147, 267.

-
- (32) Mori, H.; Summer, E. J.; Ma, X. Y.; Cline, K. *J Cell Biol* **1999**, *146*, 45.
- (33) Settles, A. M.; Yonetani, A.; Baron, A.; Bush, D. R.; Cline, K.; Martienssen, R. *Science* **1997**, *278*, 1467.
- (34) Mori, H.; Summer, E. J.; Cline, K. *FEBS Lett* **2001**, *501*, 65.
- (35) Motohashi, R.; Nagata, N.; Ito, T.; Takahashi, S.; Hobo, T.; Yoshida, S.; Shinozaki, K. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 10499.
- (36) Sargent, F.; Bogsch, E. G.; Stanley, N. R.; Wexler, M.; Robinson, C.; Berks, B. C.; Palmer, T. *EMBO J* **1998**, *17*, 3640.
- (37) Chanal, A.; Santini, C.; Wu, L. *Mol Microbiol* **1998**, *30*, 674.
- (38) Wexler, M.; Sargent, F.; Jack, R. L.; Stanley, N. R.; Bogsch, E. G.; Robinson, C.; Berks, B. C.; Palmer, T. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 16717.
- (39) Weiner, J. H.; Bilous, P. T.; Shaw, G. M.; Lubitz, S. P.; Frost, L.; Thomas, G. H.; Cole, J. A.; Turner, R. J. *Cell* **1998**, *93*, 93.
- (40) Ize, B.; Gérard, F.; Zhang, M.; Chanal, A.; Voulhoux, R.; Palmer, T.; Filloux, A.; Wu, L.-F. *J Mol Biol* **2002**, *317*, 327.
- (41) Sargent, F.; Stanley, N. R.; Berks, B. C.; Palmer, T. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 36073.
- (42) Yahr, T. L.; Wickner, W. T. *EMBO J* **2001**, *20*, 2472.
- (43) Alami, M.; Trescher, D.; Wu, L. F.; Müller, M. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 20499.
- (44) Porcelli, I.; de Leeuw, E.; Wallis, R.; van den Brink-van der Laan, E.; de Kruijff, B.; Wallace, B. A.; Palmer, T.; Berks, B. C. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13690.
- (45) Chan, C. S.; Zlomislic, M. R.; Tieleman, D. P.; Turner, R. J. *Biochemistry* **2007**, *46*, 7396.
- (46) Nolandt, O. V.; Walther, T. H.; Roth, S.; Bürck, J.; Ulrich, A. S. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1788*, 2238.
- (47) Gouffi, K.; Santini, C.-L.; Wu, L.-F. *FEBS Lett* **2002**, *525*, 65.
- (48) Punginelli, C.; Maldonado, B.; Grahl, S.; Jack, R.; Alami, M.; Schröder, J.; Berks, B. C.; Palmer, T. *J Bacteriol* **2007**, *189*, 5482.
- (49) Jack, R. L.; Sargent, F.; Berks, B. C.; Sawers, G.; Palmer, T. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1801.
- (50) De Leeuw, E.; Porcelli, I.; Sargent, F.; Palmer, T.; Berks, B. C. *FEBS Lett* **2001**, *506*, 143.
- (51) Gohlke, U.; Pullan, L.; McDevitt, C. A.; Porcelli, I.; de Leeuw, E.; Palmer, T.; Saibil, H. R.; Berks, B. C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 10482.
- (52) Oates, J.; Barrett, C. M.; Barnett, J. P.; Byrne, K. G.; Bolhuis, A.; Robinson, C. *J Mol Biol* **2005**, *346*, 295.
- (53) Bolhuis, A.; Mathers, J. E.; Thomas, J. D.; Barrett, C. M.; Robinson, C. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 20213.
- (54) Orriss, G. L.; Tarry, M. J.; Ize, B.; Sargent, F.; Lea, S. M.; Palmer, T.; Berks, B. C. *FEBS Lett* **2007**, *581*, 4091.
- (55) Tarry, M. J.; Schafer, E.; Chen, S.; Buchanan, G.; Greene, N. P.; Lea, S. M.; Palmer, T.; Saibil, H. R.; Berks, B. C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 13284.
- (56) Alami, M.; Luke, I.; Deitermann, S.; Eisner, G.; Koch, H. G.; Brunner, J.; Müller, M. *Mol Cell* **2003**, *12*, 937.
- (57) Cline, K.; Mori, H. *J Cell Biol* **2001**, *154*, 719.
- (58) de Leeuw, E.; Granjon, T.; Porcelli, I.; Alami, M.; Carr, S. B.; Müller, M.; Sargent, F.; Palmer, T.; Berks, B. C. *J Mol Biol* **2002**, *322*, 1135.
- (59) Sturm, A.; Schierhorn, A.; Lindenstrauss, U.; Lilie, H.; Brüser, T. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 13972.
-

-
- (60) Jongbloed, J. D. H.; Grieger, U.; Antelmann, H.; Hecker, M.; Nijland, R.; Bron, S.; Dijk, J. M. v. *Mol Microbiol* **2004**, *54*, 1319.
- (61) Berks, B. C. *Mol Microbiol* **1996**, *22*, 393.
- (62) Halbig, D.; Wiegert, T.; Blaudeck, N.; Freudl, R.; Sprenger, G. A. *Eur J Biochem* **1999**, *263*, 543.
- (63) Stanley, N. R.; Palmer, T.; Berks, B. C. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 11591.
- (64) Brink, S.; Bogsch, E. G.; Edwards, W. R.; Hynds, P. J.; Robinson, C. *FEBS Lett* **1998**, *434*, 425.
- (65) Brüser, T.; Deutzmann, R.; Dahl, C. *Fems Microbiology Letters* **1998**, *164*, 329.
- (66) Cristobal, S.; de Gier, J. W.; Nielsen, H.; von Heijne, G. *EMBO J* **1999**, *18*, 2982.
- (67) Bogsch, E.; Brink, S.; Robinson, C. *EMBO J* **1997**, *16*, 3851.
- (68) San Miguel, M.; Marrington, R.; Rodger, P. M.; Rodger, A.; Robinson, C. *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*, 3345.
- (69) Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947.
- (70) Waterhouse, A. M.; Procter, J. B.; Martin, D. M. A.; Clamp, M.; Barton, G. J. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1189.
- (71) Nesmeyanova, M. A.; Karamyshev, A. L.; Karamysheva, Z. N.; Kalinin, A. E.; Ksenzenko, V. N.; Kajava, A. V. *Febs Letters* **1997**, *403*, 203.
- (72) Briggs, M.; Cornell, D.; Dluhy, R.; Gierasch, L. *Science* **1986**, *233*, 206.
- (73) Shanmugham, A.; Wong Fong Sang, H. W.; Bollen, Y. J.; Lill, H. *Biochemistry* **2006**, *45*, 2243.
- (74) Hoyt, D. W.; Gierasch, L. M. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 14406.
- (75) Hoyt, D. W.; Gierasch, L. M. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10155.
- (76) Keller, R. C. A.; ten Berge, D.; Nouwen, N.; Snel, M. M. E.; Tommassen, J.; Marsh, D.; de Kruijff, B. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3063.
- (77) Von Heijne, G. *J Membr Biol* **1990**, *115*, 195.
- (78) Roise, D.; Theiler, F.; Horvath, S. J.; Tomich, J. M.; Richards, J. H.; Allison, D. S.; Schatz, G. *The EMBO journal* **1988**, *7*, 649.
- (79) Pfanner, N. *Current Biology* **2000**, *10*, R412.
- (80) Shai, Y. *Peptide Science* **2002**, *66*, 236.
- (81) Zasloff, M. *Nature* **2002**, *415*, 389.
- (82) Provencher, S. W.; Gloeckner, J. *Biochemistry* **1981**, *20*, 33.
- (83) van Stokkum, I. H. M.; Spoelder, H. J. W.; Bloemendal, M.; van Grondelle, R.; Groen, F. C. A. *Analytical Biochemistry* **1990**, *191*, 110.
- (84) Sreerama, N.; Woody, R. W. *Analytical Biochemistry* **2000**, *287*, 252.
- (85) Lobley, A.; Whitmore, L.; Wallace, B. A. *Bioinformatics* **2002**, *18*, 211.
- (86) Whitmore, L.; Wallace, B. A. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, W668.
- (87) Cole, C.; Barber, J. D.; Barton, G. J. *Nucleic Acids Research* **2008**, *36*, W197.
- (88) Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S. e.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. 2005, p 571.
- (89) Petersen, B.; Petersen, T.; Andersen, P.; Nielsen, M.; Lundegaard, C. *BMC Structural Biology* **2009**, *9*, 51.
- (90) Gautier, R.; Douguet, D.; Antonny, B.; Drin, G. *Bioinformatics* **2008**, *24*, 2101.
- (91) Shen, Y.; Delaglio, F.; Cornilescu, G.; Bax, A. *Journal of Biomolecular NMR* **2009**, *44*, 213.
- (92) Seelig, J.; Macdonald, P. M.; Scherer, P. G. *Biochemistry* **1987**, *26*, 7535.

-
- (93) Scherer, P. G.; Seelig, J. *Biochemistry* **1989**, *28*, 7720.
- (94) Bonev, B. B.; Morrow, M. R. *Biophysical Journal* **1995**, *69*, 518.
- (95) Grage, S. L.; Keleshian, A. M.; Turdzeladze, T.; Battle, A. R.; Tay, W. C.; May, Roland P.; Holt, S. A.; Contera, S. A.; Haertlein, M.; Moulin, M.; Pal, P.; Rohde, P. R.; Forsyth, V. T.; Watts, A.; Huang, K. C.; Ulrich, Anne S.; Martinac, B. *Biophysical Journal* **2011**, *100*, 1252.
- (96) Fincher, V.; McCaffery, M.; Cline, K. *Febs Letters* **1998**, *423*, 66.
- (97) Kuhn, A.; Kiefer, D.; Köhne, C.; Zhu, H.-Y.; Tschantz, W. R.; Dalbey, R. E. *European Journal of Biochemistry* **1994**, *226*, 891.
- (98) Shaw, A. S.; Rottier, P. J.; Rose, J. K. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1988**, *85*, 7592.
- (99) Lange, C.; Müller, S. D.; Walther, T. H.; Bürck, J.; Ulrich, A. S. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1768*, 2627.
- (100) Müller, S. D.; De Angelis, A. A.; Walther, T. H.; Grage, S. L.; Lange, C.; Opella, S. J.; Ulrich, A. S. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1768*, 3071.
- (101) Walther, T. H.; Grage, S. L.; Roth, N.; Ulrich, A. S. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 15945.

10 Anhang

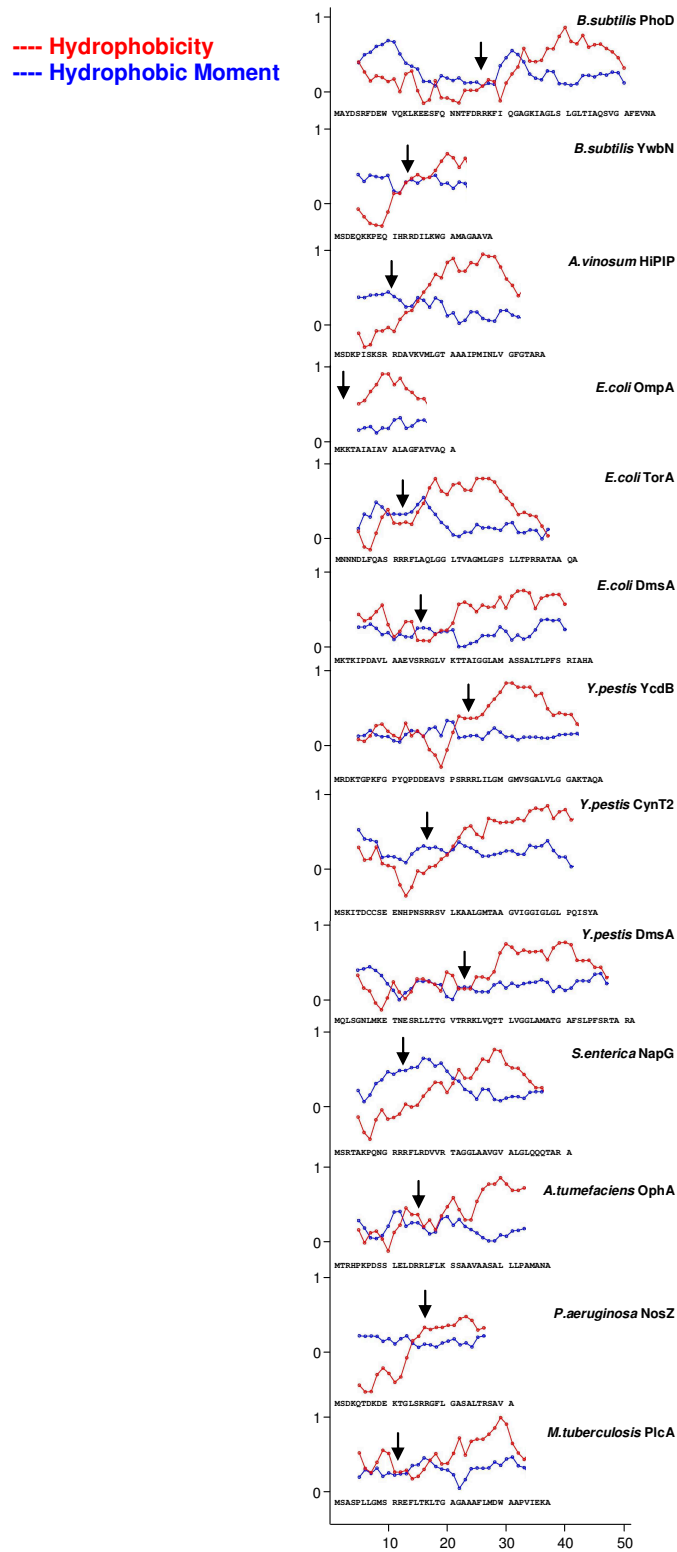


Abbildung 39 Hydrophobizitätsuntersuchung und Bestimmung des hydrophoben Moments verschiedener Tat-Signalsequenzen, die aufgrund ihres N-terminalen Bereiches eine amphiphile α -Helix ausbilden könnten.

11 Publikationsliste

11.1 Beiträge in referenzierten Zeitschriften

- (1) *“Structure analysis of the prePhoD signal peptide: functional implications on how an amphiphilic helix approaches the Tat translocase”*
Klein, M.J.; Grage, S.L.; Muhle-Goll, C.; Bürck, J.; Ulrich, A.S.
Biophys. J., 2012. submitted
- (2) *“Localisation of the pore-forming subunit TatA_d of the twin arginine translocase within the lipid bilayer”*
Klein, M.J.; Gehman, J.; Separovic, F; Ulrich, A.S.; Grage, S.L.
BBA, 2012. in preparation
- (3) *“Interaction of the components of the twin arginine translocase complex studied using small angle neutron scattering”*
Klein, M.J.; Walther, T.H.; Nolandt, O.; Callow, P.; Teixeira, S.; Demé, B.; Grage, S.L.; Ulrich, A.S.
2012. in preparation

11.2 Tagungsbeiträge

- (1) *“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.; De Angelis, A.A.; Opella, S.J.; Ulrich, A.S.
8th Internat.Conf.on Magnetic Resonance in Biological Systems, San Diego, Calif., August 24-29, 2008
- (2) *“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.; Ulrich, A.S.; Grage, S.L.
CFN Summer School on Nano-Biology, Bad Herrenalb, September 8-11, 2009
- (3) *“Pore formation and structure of the twin arginine translocase subunit TatA from B.subtilis.”*

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

53rd Biophysical Society's Annual Meeting, Boston, Mass., February 28 -
March 4, 2009

- (4) *"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.; Walther, T.H.; Nolandt, O.; Afonin, S.;
Grage, S.L.; Ulrich, A.S.
24th Internat.Conf.on NMR in Biological Systems, Cairns, AUS, August 22-27,
2010

- (5) *"Pore formation of the twin arginine translocase probed by fluorescence correlation spectroscopy."*

Gottselig, C.; Klein, M.J.; Perez, J.; Grage, S.; Naber, A.; Ulrich, A.S.
Biophysics of Membrane-Active Peptides : 455th WE-Heraeus-Seminar, Bad
Honnef, April 11-14, 2010

- (6) *"Molecular interactions between the components of the twin arginine translocase complex studied using neutron scattering on oriented lipid bilayers."*

Grage, S.L.; Klein, M.J.; Nolandt, O.; Walther, T.H.; Callow, P.; Ulrich, A.S.
BILL2011 : Bilayers at the ILL, Grenoble, F, January 12-14, 2011

- (7) *"Folding and self-assembly of the pore-forming unit Tat-A of the bacterial twin-arginine translocase."*

Grage, S.L.; Walther, T.H.; Wolf, M.; Vargiu, A.; Klein, M.J.; Ruggerone, P.;
Wenzel, W.; Ulrich, A.S.
Biophysical Society 55th Annual Meeting, Baltimore, Md., March 5-9, 2011
Biophysical Journal, 100(2011) Issue 3 Suppl.1, S.345a (Abstract)

- (8) *"What can we get from the head? Interaction of different TatA_d constructs with the phospholipid bilayer."*

Klein, M.J.; Gehman, J.; Separovic, F.; Walther, T.H.; Grage, S.L. Ulrich, A.S.
CFN Summer School on Nano-Biology, Bad Herrenalb, September 7-10, 2011

12 Lebenslauf

Marco Jan Klein

<i>Persönliche Daten</i>	Geburtsdatum: Geburtsort:	23.10.1982 Gernsbach
<i>Schule</i>	1993-2002	Humboldt-Gymnasium Karlsruhe
	Juni 2002	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
<i>Zivildienst</i>	2002-2003	Zivildienst in der Evangelischen Sozialstation Nord in Karlsruhe
<i>Studium</i>	2003-2005	Grundstudium Diplom Chemie an der Universität Karlsruhe (TH)
	2005-2008	Hauptstudium Diplom Chemie an der Universität Karlsruhe (TH)
	September 2005 September 2008	Vordiplom Chemie Diplom Chemie
<i>Arbeiten</i>	2007	Vertieferarbeit am Institut für Organische Chemie Lehrstuhl für Biochemie (AK Ulrich) „Expression und Aufreinigung des Tat-abhängigen Signalpeptids von prePhoD aus <i>B.subtilis</i> “
	2008	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie Lehrstuhl für Biochemie (AK Ulrich) „Das Tat-abhängige Signalpeptid von prePhoD“
<i>Promotionsstudium</i>	seit Februar 2009	Promotionsstudium am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie (AK Ulrich) Dissertation: „Membraninteraktionen der Tat-Translokase von PhoD aus <i>B.subtilis</i> “
<i>Beruflicher Werdegang</i>	seit Februar 2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Karlsruher Institut für Technology (KIT), Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie
	Okt. 2009 - Dez. 2009	Nebenberufliche Dozentur „Organische und Biochemische Analytik“ an der Dualen Hochschule Baden-Württemberg (DHBW)

	Okt. 2010 - Dez. 2010	Nebenberufliche Dozentur „Organische und Biochemische Analytik“ an der Dualen Hochschule Baden-Württemberg (DHBW)
	Okt. 2011 - Dez. 2011	Nebenberufliche Dozentur „Organische und Biochemische Analytik“ an der Dualen Hochschule Baden-Württemberg (DHBW)
<i>Berufliche Fortbildung</i>	Apr. 09 - Jul. 09	Kurs: “Start in die Lehre - Tutorenprogramm der Universität Karlsruhe“, Karlsruhe, Deutschland
	September 2009	“Event management - Organisation of the international CFN Summer School on Nanobiology 2009“, Bad Herrenalb, Deutschland
	Juni 2010	GTPB-The Gulbenkian Training Programme in Bioinformatics, 11th Edition, Kurs: „Macromolecular NMR assignment with CcpNmr Analysis“, Instituto Gulbenkian de Ciência, Lissabon, Portugal
	August 2010	Teilnahme mit Posterbeitrag an der International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Cairns, Australien
	September 2011	“Event management - Organisation of the international CFN Summer School on Nanobiology 2011“, Bad Herrenalb, Deutschland
<i>Weiterbildung</i>	Oktober 2009	Sprachkurs - Französisch 1, Karlsruhe, Deutschland
	März 2010	Sprachkurs - Französisch 2, Karlsruhe, Deutschland
	Oktober 2010	Sprachkurs - Französisch 3, Karlsruhe, Deutschland
<i>Auslandsaufenthalt</i>	Aug. 2010 - Sep. 2010	Forschungsaufenthalt zur Festkörper-NMR-Spektroskopie bei Prof. Frances Separovic an der University of Melbourne, Melbourne, Australien