

# Strukturuntersuchungen am bakteriellen Tat-Proteinexportsystem

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Chemikerin Sonja Müller

aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. H. Puchta  
Referent: Prof. Dr. A. S. Ulrich  
Korreferent: Prof. Dr. C. Richert  
Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2007

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2004 bis Mai 2007 am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie an der Universität Karlsruhe (TH) und am Institut für biologische Grenzflächen, Forschungszentrum Karlsruhe unter der Leitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich. Darüber hinaus wurden Teile der Arbeit in der Zeit von September 2006 bis Dezember 2006 an der University of California, San Diego in der Gruppe von Prof. Dr. Stanley J. Opella (USA) angefertigt.

## Danksagung

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich aussprechen für die interessante Themenstellung, für ihre fortwährende Unterstützung, das mir entgegengebrachte Vertrauen, ihr Interesse an meiner Arbeit und, dass sie immer ein offenes Ohr für mich, meine Probleme, sowie für meine Ideen hatte.

Weiterhin möchte ich herzlich danken:

Dr. Christian Lange und Dipl.-Chem. Torsten Walther für die fruchtbare Zusammenarbeit am TatA-Projekt.

Dr. Stephan Grage für seine ständige Hilfsbereitschaft am NMR-Spektrometer, für die konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen und für viele kompetente Antworten.

Dr. Sergii Afonin für interessante wissenschaftliche Diskussionen, seine immerwährende Hilfsbereitschaft und die Messung der MALDI-MS-Spektren.

Dem CD- und OCD-Team Frau Heide Mathieu, Herrn Siegmund Roth und insbesondere Herrn Dr. Jochen Bürck für seine Hilfsbereitschaft bei allen Fragen rund um die CD- und OCD-Spektroskopie und die Durchführung vieler Messungen.

Meinen Mitstreiterinnen im Genetikpraktikum Soraya Benamira und Deniz Tiltak, sowie Dr. Birgid Langer für ihre immer freundliche Unterstützung, Hilfsbereitschaft und für ihre gute und unbürokratische Organisation.

Prof. Dr. Stanley J. Opella und seiner gesamten Gruppe für die gute Zusammenarbeit, die große Hilfsbereitschaft und eine sehr schöne Zeit in San Diego. Insbesondere möchte ich Dr. Anna De Angelis und Dr. Alexander Nevzorov sehr herzlich für die gute Betreuung, die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und für eine Menge Spaß danken. Dr. Francesca M. Marassi danke ich für die großzügige Messzeit an ihrem NMR-Spektrometer im Burnham Institut, La Jolla.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Arbeitskreises Ulrich, sowohl in der Uni als auch im Forschungszentrum Karlsruhe, für eine tolle Arbeitsatmosphäre! Insbesondere möchte ich Deniz Tiltak, Steffi Maurer, Steffi Volmer, Pierre Tremouilhac und Daniel Maisch, für und eine Menge Spaß auch außerhalb der Arbeitszeit danken!

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meinem Freund Stephan von ganzem Herzen für ihre unermüdliche Unterstützung danken!

---

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Motivation.....	1
1.2. Biologischer Hintergrund.....	2
1.2.1. Proteintransport .....	2
1.2.2. Der Zwillings-Arginin ( <i>twin arginine</i> ) Translokationsweg (Tat) .....	4
1.2.3. Die Tat-Translokase transportiert gefaltete Proteine.....	4
1.2.4. Die Komponenten des Tat-Translokationsapparats .....	5
1.2.5. Die Translokationspore .....	7
1.2.6. Modell für den Tat-Mechanismus in <i>E. coli</i> und Thylakoiden .....	7
1.2.7. Qualitätskontrolle des Tat-Apparats.....	9
1.2.8. Das Tat-abhängige Translokationssystem in <i>B. subtilis</i> und anderen Gram-positiven Bakterien.....	10
1.2.9. Die doppelte Funktion von TatA in Gram-positiven Bakterien.....	10
1.2.10. TatA <sub>d</sub> aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	11
1.2.11. Nutzung verschiedener Proteinkonstrukte zur Proteinstrukturaufklärung .....	12
1.3. Strukturaufklärung von Membranproteinen .....	13
1.3.1. Modellsysteme für die Strukturuntersuchung von Membranproteinen.....	14
1.3.2. OCD-Spektroskopie .....	17
1.3.3. Festkörper-NMR-Spektroskopie .....	19
<b>2. Aufgabenstellung .....</b>	<b>30</b>
<b>3. Materialien und Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.1. Materialien .....	31
3.1.1. Expressionsstämme .....	31
3.1.2. Marker für SDS-PAGE .....	31
3.2. Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen.....	32
3.2.1. Medien für molekularbiologische Arbeiten.....	32
3.2.2. Stammlösungen für molekularbiologische Arbeiten .....	33
3.2.3. Puffer für die Gelelektrophorese .....	35
3.2.4. Stammlösungen für die Gelelektrophorese .....	36
3.2.5. Puffer für die Proteinisolierung.....	37
3.2.6. Verwendete Software .....	38
3.3. Methoden .....	38
3.3.1. Mikrobiologische Arbeitstechniken .....	38
3.3.2. Proteinchemische Arbeitstechniken .....	39
3.3.3. Massenspektrometrie (MALDI-TOF) .....	48
3.3.4. Rekonstituierung der Proteine in eine Modellmembran.....	48
3.3.5. CD-Spektroskopie (Circulardichroismus).....	51
3.3.6. Orientierte CD (OCD)-Spektroskopie.....	53

---

3.3.7. Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie .....	55
3.3.8. Festkörper-NMR-Spektroskopie .....	56
3.3.9. Simulationen.....	64
3.3.10. Abschätzung der Rotations-Korrelationszeit.....	64
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
4.1. Expression, <i>in vivo</i> - <sup>15</sup> N-Markierung und Aufreinigung von TatA <sub>d</sub> und seinen Konstrukten.....	66
4.1.1. Expression der TatA-Proteine .....	66
4.1.2. Proteinisolierung und Reinigung.....	70
4.1.3. Charakterisierung mittels MALDI-MS .....	75
4.2. CD-Spektroskopie.....	76
4.2.1. CD-Spektroskopie an TatA <sub>22-70</sub> .....	76
4.2.2. CD-Spektroskopie an TatA <sub>d</sub> und TatA <sub>2-45</sub> .....	78
4.3. OCD-Spektroskopie.....	79
4.3.1. OCD-Spektroskopie an TatA <sub>d</sub> und TatA <sub>22-70</sub> .....	80
4.3.2. OCD-Spektroskopie an TatA <sub>2-45</sub> .....	81
4.4. Flüssigkeits- NMR.....	83
4.4.1. <sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N-HSQC-NMR-Spektroskopie .....	83
4.5. Festkörper-NMR.....	87
4.5.1. Festkörper-NMR-Spektroskopie an TatA <sub>22-70</sub> .....	87
4.5.2. Festkörper-NMR-Spektroskopie von TatA <sub>2-45</sub> .....	92
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>101</b>
5.1. Expression, <sup>15</sup> N-Markierung und Aufreinigung der Proteine.....	101
5.2. CD- und OCD-Spektroskopie .....	102
5.3. Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie.....	103
5.4. Festkörper-NMR-Spektroskopie.....	104
5.5. Vergleich der spektroskopischen Ergebnisse und Ausblick .....	108
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>111</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>112</b>

---

# 1. Einleitung

## 1.1. Motivation

Das Zwillings-Arginin-Translokationssystem (Tat) ist ein besonderer Proteintransportapparat, mit dem Proteine in nativem gefaltetem Zustand durch die Zellmembran geschleust werden können. Dadurch ist es der Zelle möglich, Proteine mit Kofaktoren, Proteinkomplexe und andere Proteine, die für den generellen *Sec*-Transportweg inkompatibel sind, zu transportieren [1,2]. Das Tat-Translokationssystem ist nicht nur als viel versprechendes System für die Biotechnologie von großem Interesse, um industriell hergestellte heterologe Proteine aus ihren Wirtsorganismen zu schleusen. Es hat sich auch gezeigt, dass der Tat-Weg eine Rolle bei der Virulenz pathologischer Bakterien spielt und in diesen hochkonserviert ist, wohingegen er in Säugetieren nicht vorkommt. Damit ist dieses System ein Ziel für die Entwicklung neuer antimikrobieller Wirkstoffe [3].

Der Tat-Translokationsapparat besteht in *Bacillus subtilis* aus integralen substratspezifischen TatA und TatC-Proteinen [4]. Weder der Mechanismus der Tat-abhängigen Translokation noch die Struktur der Proteine und der daraus zusammengesetzten Translokase sind bisher bekannt. Wie kann das Tat-System die Undurchlässigkeit der Membran gegenüber anderen Stoffen aufrechterhalten und gleichzeitig gefaltete Proteine in einer Größe von 7 nm transportieren? Ist TatA die porenbildende Einheit? Aus wie vielen Protomeren würde eine solche Transport-Pore bestehen? Besteht TatA, wie vorhergesagt, aus einer membrandurchspannenden Helix? Zur Klärung dieser Fragen stellt die Untersuchung der Sekundärstruktur sowie der Topologie und Ausrichtung des Proteins TatA<sub>d</sub> in seiner Membranumgebung einen entscheidenden Schritt dar.

---

## 1.2. Biologischer Hintergrund

### 1.2.1. Proteintransport

Der Transport von Proteinen über eine Membran (Translokation) ist ein essentieller Mechanismus in allen lebenden Zellen. Zellen sind durch Biomembranen, bestehend aus hydrophoben Phospholipiddoppelschichten, von ihrer Umgebung abgegrenzt und in Reaktionsräume (Kompartimente) unterteilt. Die Membran stellt eine Permeabilitätsbarriere für Ionen und größere Moleküle dar, wohingegen sie für kleine neutrale Moleküle wie Wasser und hydrophobe Substanzen durchlässig ist. Da die meisten Proteine im Cytosol der Zelle synthetisiert werden, müssen sie, sofern sie nicht für dieses Kompartiment bestimmt sind, Membranen überwinden, um an ihren Bestimmungsort zu gelangen. Die Proteine werden von der Zelle sortiert und besitzen hierfür bestimmte Signalsequenzen (*targeting signals*), die ihre spezifische Transportroute und ihren Zielort in oder außerhalb der Zelle bestimmen. Die meisten Proteine werden als Vorläuferproteine (*precursor*) mit einem meist N-terminalen Signalpeptid synthetisiert, welches von einem Rezeptor der Translokase erkannt und nach dem Transport von spezifischen Peptidasen abgespalten wird. Manche Proteine besitzen auch Signalstrukturen, die erst in gefaltetem Zustand wirksam werden und das Protein adressieren [5]. Die Proteintransporter (Translokasen) selbst bestehen meist aus Multi-Enzym-Komplexen, die je nach Organismus und Transportweg verschieden zusammengesetzt sind.

In eukaryotischen Zellen, welche eine Vielzahl funktionell unterschiedlicher Kompartimente besitzen (Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat und Zellorganellen wie Mitochondrien, Chloroplasten, Lysosomen und Peroxisomen) gibt es vielfältige Transportmechanismen. Proteine, die für ER, Golgi-Apparat, Lysosomen, Plasma- oder Organellmembranen (Membranproteine) oder zur Sekretion aus der Zelle heraus bestimmt sind werden über ihre Signalsequenz von dem Ribonucleoproteinkomplex SRP (*signal recognition particle*) erkannt und co- oder posttranslational an das raue ER geleitet, wo sie von einem SRP-Rezeptor erkannt und mit einem Translokase Komplex durch die ER-Membran in das Lumen geschleust werden [6,7]. Im Lumen des rauhen ER faltet sich das Protein, von Chaperonen geschützt, und wird posttranslational modifiziert. Von dort aus gelangt das Protein, in Vesikel verpackt, in den Golgi-Apparat, in dem weitere Modifikationen geschehen können, und schließlich in sein Zielkompartiment oder aus der Zelle heraus (Exocytose).

Proteine, die für den Zellkern, Mitochondrien, Chloroplasten oder Peroxisomen bestimmt sind, werden, von Chaperonen eskortiert, direkt zu den betreffenden Membranen geliefert, wo

---

ihr Signalpeptid von dem Translokator des betreffenden Organells erkannt und eingeschleust wird.

Prokaryoten, welche weniger komplex aufgebaut sind, besitzen keine Zellorganellen. Während Gram-positive Bakterien nur eine Zellmembran (Plasmamembran) und eine dicke Zellwand besitzen, haben Gram-negative Bakterien eine dünne Zellwand, dafür jedoch eine zusätzliche Außenmembran, welche den periplasmatischen Raum abgrenzt und Enzyme und andere wichtige Stoffe am Wegdiffundieren hindert. Für die Proteinsekretion bzw. den Transport ins Periplasma, welcher bei Prokaryoten posttranslational geschieht, stehen ihnen im Wesentlichen zwei Proteinexportrouten zur Verfügung: (1) Der gut erforschte generelle Sekretionsweg (Sec-Weg) [8,9], über den der Großteil der Proteine transloziert wird und dessen Translokationsapparat dem im ER eukaryotischer Zellen analog ist [10], und (2) der erst kürzlich entdeckte Zwillings-Arginin-Weg (Tat-Weg) [3], welcher ebenso in Thylakoiden von Chloroplasten und in Archaea existiert. Außer diesen Mechanismen stehen Gram-negativen Bakterien noch spezielle Translokationssysteme (Sekretions-Typ I-V) zur Verfügung, um Proteine durch beide Membranen über das Periplasma hinweg aus der Zelle heraus zu exportieren.

Die Proteintranslokation ist ein aktiver Prozess, der Energie in Form von ATP, GTP oder in Form des elektrochemischen Gradienten der Membran erfordert.

Während die Substrate der Sec-Translokase in einer weitgehend ungefalteten Konformation exportiert werden, ist das Tat-Translokationssystem in der Lage, seine Substrate in gefaltetem Zustand zu translozieren. Dies ist in Bakterien einzigartig und wurde in eukaryotischen Zellen lediglich für den Import von Proteinen in Peroxisomen gefunden [11].

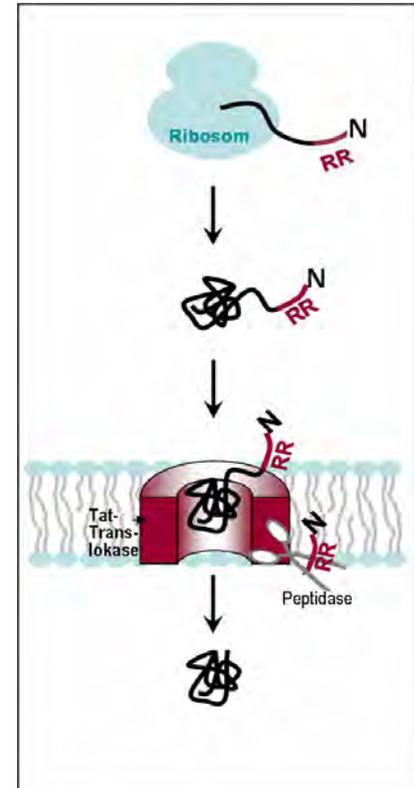
### 1.2.2. Der Zwillings-Arginin (*twin arginine*) Translokationsweg (Tat)

Der Zwillings-Arginin-Weg ist erst seit wenigen Jahren bekannt und wurde erstmals 1991 von Mould und Robinson in der Tylakoidmembran der Chloroplasten von Mais (*Zea mays*) entdeckt [12,13,14]. Kurz danach wurde dieser Translokationsweg auch in *E. coli* identifiziert [15,16,17] und stellte sich später als weit verbreitet, wenn auch nicht ubiquitär, in höherentwickelten Pflanzen, Prokaryoten und Archaea [18] heraus.

Der Tat-Translokationsweg agiert parallel zum generellen Sec-Weg und verläuft in Gegensatz zu letzterem ATP-unabhängig, den pH-Gradienten der Membran ( $\Delta pH$ ) als einzige Triebkraft nutzend [19,20].

Proteine, die für den Tat-Weg bestimmt sind, werden als Vorläuferproteine mit Signalpeptiden synthetisiert, die ein hoch konserviertes Sequenzmuster mit zwei aufeinander folgenden Argininresten, ein S-R-R-x-F-L-K-Motiv [21]

nahe des Aminoterminus aufweisen. Konservativer Austausch von einem der beiden Argininreste zu Lysin führt zu verringerter Exporteffizienz und Austausch beider Argininreste zur völligen Blockierung des Tat-abhängigen Transports [22,23]. Aufgrund dieses konservierten Zwillings-Argin-Signals erhielt das System seinen Namen Tat, für *twin arginine translocation* [16]. Eine schematische Darstellung der Tat-abhängigen Translokation ist in Abb. 1 gezeigt.



**Abb. 1:** Schema der tat-abhängigen Proteintranslokation: Das am Ribosom mit einem Zwillings-Arginin-Signalpeptid synthetisierte Vorläuferprotein faltet sich im Cytosol und wird anschließend von der strukturell noch unbekanntem Tat-Translokase durch die Membran geschleust. Das Signalpeptid wird nach seiner Nutzung von einer spezifischen membranständigen Peptidase (Symbol: Schere) abgespalten.

### 1.2.3. Die Tat-Translokase transportiert gefaltete Proteine

Während die Substrate des Sec-Translokationswegs, von Helferproteinen in ungefalteter transportkompetenter Konformation gehalten, mit dem Aminoterminus voran in die Translokationspore eingefädelt und in entfalteter Konformation durchgeschleust werden müssen, transportiert die Tat-Translokase ihre Substrate in gefaltetem Zustand über die

Cytoplasma- bzw. Thylakoidmembran [24]. Diese Besonderheit ermöglicht es der Zelle Proteine zu exportieren, welche zuvor im Cytoplasma Kofaktoren binden, und daher gefaltet sein müssen, beispielsweise Proteine, die eine Rolle in der Elektronentransportkette der Photosynthese oder der Zellatmung spielen [25]. In Gram-negativen Bakterien findet ein Teil der Energiemetabolismus-Prozesse im Periplasma statt, daher müssen Redox-Kofaktoren enthaltende und daher gefaltete Proteine über die Cytoplasmamembran transportiert werden [3]. Des Weiteren können heterooligomere Proteinkomplexe transportiert werden, wie etwa die Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR), ein homotetrameres Redoxenzym, dessen Untereinheiten je einen NADP-Kofaktor enthalten [26]. Bei einigen heterooligomeren Substrat-Komplexen besitzt nur eine Untereinheit das Zwillings-Arginin-Signalpeptid. Der Komplex muss sich erst zusammenfügen um komplett transportiert werden zu können [2].

Es sind allerdings auch Tat-Substrate bekannt, die ihre Kofaktoren erst nach dem Transport einfügen oder keine Kofaktoren enthalten. Möglicherweise falten diese Proteine zu schnell oder zu stabil um für den Sec-Weg kompatibel zu sein. Es wurde gezeigt, dass der Zwillings-Arginin-Translokationsweg außer für den Energiemetabolismus auch noch essentiell für Zellwandsynthese [27], Schwermetallresistenz [28], symbiotische Stickstofffixierung [29] und bakterielle Infektion von Tieren und Pflanzen [30,31] ist.

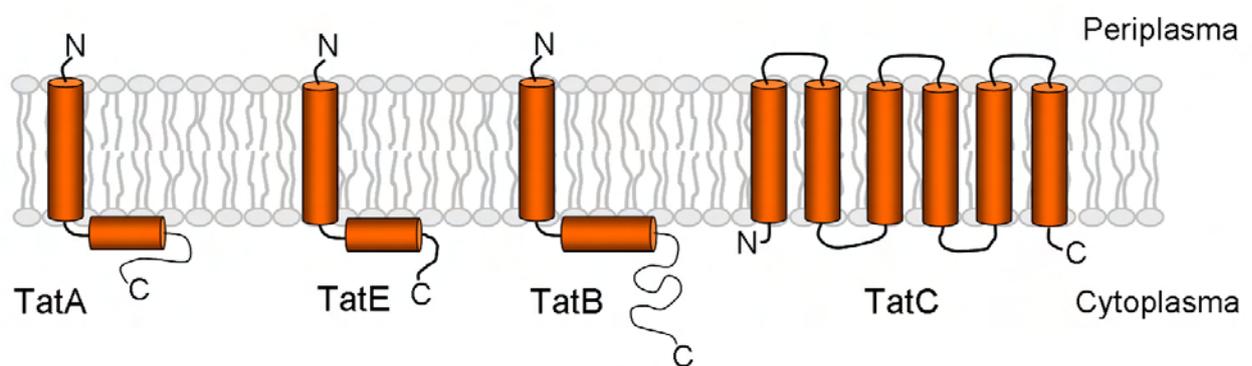
Die Tat-Translokase ist in der Lage Substrate bis zu 7 nm zu transportieren [32,33]. Wie dies möglich ist, ohne die Membran für Ionen permeabel zu machen, bleibt eine zu klärende Frage.

#### **1.2.4. Die Komponenten des Tat-Translokationsapparats**

Der Tat-Translokationsapparat wurde ausgiebig in dem Modellorganismus *E. coli* untersucht und es wurden die integralen Proteine TatA, TatB, TatE und TatC durch genetische Analyse identifiziert. TatE scheint eine redundante, durch Genduplikation entstandene Kopie von TatA zu sein (die Proteine sind zu 60% identisch) und für das Funktionieren der Translokase reicht eine der Komponenten TatA oder TatE aus [16]. Homologe Tat-Komponenten wurden auch in anderen Bakterien, Archaea und Thylakoiden gefunden, wobei den meisten Gram-positiven Prokaryoten ein TatB-Homolog fehlt. Der Tat-Weg der Chloroplasten wird auch cp-Weg oder  $\Delta$ pH-Weg genannt, und die chloroplastidäre Translokase besteht aus den Proteinen Tha4 (ein TatA-Homolog), Hcf106 (ein TatB-Homolog) und cpTatC (ein TatC-Homolog).

Die Struktur der Tat-Komponenten ist bisher unbekannt, es liegen jedoch sequenzbasierte Vorhersagen vor (siehe Abb. 2). Obwohl die Homologie der Tat-Komponenten TatA/TatE und TatB gering ist und die einzige absolut konservierte Aminosäure ein Glycin am Ende des

aminoterminalen Segments ist, ist ihre Struktur nach einer Vorhersage von Settels 1997 [14] sehr ähnlich. Hiernach bestehen diese Proteine aus einer aminoterminalen Transmembranhelix, gefolgt von einer amphiphilen  $\alpha$ -Helix und einem möglicherweise unstrukturierten C-Terminus variabler Länge. Diese C-terminale Region hat sich bei Verkürzungsanalysen als nicht essentiell für den Tat-abhängigen Proteintransport herausgestellt [34]. Das extramembranäre Segment dieser Proteine enthält eine positive Nettoladung und bindet vermutlich elektrostatisch an die cytoplasmatische Seite der Plasmamembran [32]. Es wurde zudem gefunden, dass dieses Segment auf der cytoplasmatischen Seite Proteasen zugänglich ist [35].



**Abb. 2:** Vorhergesagte Topologie der Komponenten der Tat-Translokase nach Settels (1997). TatA, TatE, TatB haben demnach eine ähnliche Topologie mit einer N-terminalen membrandurchspannenden und einer auf der Cytoplasmatischen Seite lokalisierten amphiphilen Helix, während TatC sechs Transmembranhelices besitzt, deren Termini beide im Cytoplasma bzw. Stroma lokalisiert sind. Abbildung verändert nach Berks 2000 [32]

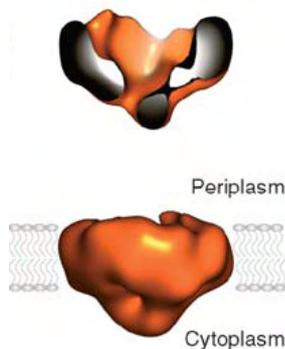
Das größere und am höchsten konservierte Protein TatC enthält nach der Vorhersage von Settels sechs membrandurchspannende  $\alpha$ -Helices, wobei sowohl N- als auch C-Terminus cytoplasmatisch lokalisiert sind. Gouffi et al. (2002) [36] schlug aufgrund von Studien mit kompartmentssensitiven Reporterfusionsproteinen vier transmembran- und zwei periplasmatisch lokalisierte  $\alpha$ -Helices vor.

Für TatA schlug Gouffi eine duale Topologie des amphiphilen Segments vor, indem die amphiphile Helix während des Translokationsmechanismus von planarer zu transmembraner Lokalisierung wechselt [37]. Hierdurch könnte eine hydrophile wassergefüllte Pore geschaffen werden, welche möglicherweise globuläre Proteine durch die Membran hindurchleitet.

### 1.2.5. Die Translokationspore

Da TatA in hohem molekularem Überschuss in der Zelle vorliegt und in mehreren Studien hochmolekulare homo- und heterooligomere TatA- und TatAB-Komplexe gefunden wurden [35,38,39,40,41,42], wird TatA als Kandidat für die proteindurchleitende Pore gehandelt.

Sargent et al. (2001) fanden mittels Negativkontrastierungs- (*negativ stain*)-Elektronenmikroskopie einen TatAB-Komplex mit 20-fachem Überschuss an TatA [42] und einem Innendurchmesser von ca. 7 nm, was der Größe der Tat-Substrate entspricht. Gohlke et al. (2005) [43] konnten mittels Elektronenmikroskopie mit der Technik der quasi-konischen Kippung (*random conical tilt*) negativkontrastierter Proben besser aufgelöste dreidimensionale Bilder von ringförmigen homooligomeren TatA-Komplexen variabler Größe mit hohlem Innenraum und Verschluss auf einer Seite beobachten (siehe Abb. 3).



**Abb. 3:** Dreidimensionales Bild eines von Gohlke et al. mittels Elektronenmikroskopie gefundenen TatA-Porenkomplexes. Abbildung verändert übernommen von Gohlke et al. 2005 [43].

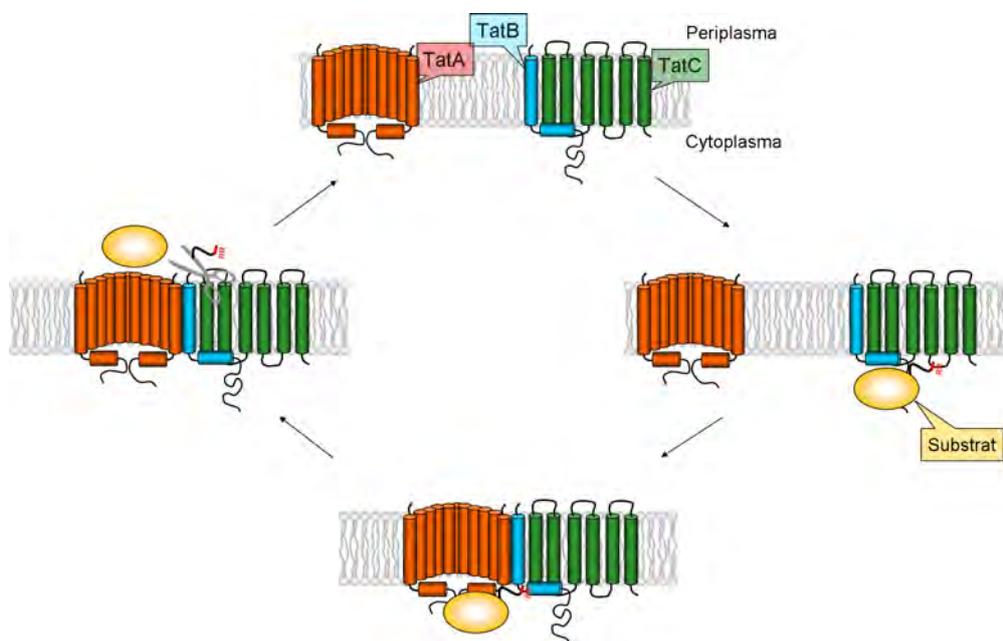
Es wurde vermutet, dass die aus 12-35 TatA-Protomeren bestehenden Porenkomplexe ihre Größe dem zu translozierenden Substrat anpassen könnten, und so die Aufrechterhaltung des Ionen und pH-Gradienten der Membran leichter ermöglicht werden könnte.

Auch in *B. subtilis* wurden mittels Negativkontrastierungs- bzw. Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie solche Multi-TatA-Komplexe, sowohl isoliert in Detergenz-Mizellen als auch in Vesikel eingebettet, mit einem durchschnittlichen Außendurchmesser von 10 nm beobachtet [44]. TatA scheint selbst in Abwesenheit von Substrat und anderen Faktoren zur Bildung eines Porenkomplexes zu neigen.

### 1.2.6. Modell für den Tat-Mechanismus in *E. coli* und Thylakoiden

Für die Tat-abhängige Translokation in *E. coli* und Thylakoiden, wurde, gestützt auf zahlreiche Studien, folgender Mechanismus vorgeschlagen (siehe Abb. 4): Im Ruhezustand der Tat-Translokase liegen zwei getrennte Multiproteinkomplexe vor, ein TatA-Homooligomerkomplex und ein TatBC Komplex [37,45]. Das gefaltete Tat-Substrat bindet

mit seiner Doppelarginin-Erkennungssequenz im Signalpeptid an eine Rezeptorstelle in TatC [46,47]. Daraufhin lagert sich der substratgebundene TatBC-Komplex mit dem TatA-Komplex  $\Delta$ pH-getrieben zu einem TatABC-Multienzymkomplex zusammen [48]. TatA bildet eine Pore flexibler Größe, durch die das gefaltete Protein geschleust wird. Direkt nach der Translokation spaltet eine membranständige Peptidase (bei *E. coli* LepB, eine Signalpeptidase, die auch im Sec-Weg eine Rolle spielt) das Signalpeptid ab um das reife Tat-Substrat in das Periplasma bzw. in das Thylakoidlumen freizusetzen [2,49]. Nach Beendigung des Translokationsprozess dissoziieren der TatA- und der TatBC-Komplex wieder auseinander.



**Abb. 4:** Modell des Tat-Translokationszyklus in *E. coli* und Thylakoiden. Erklärung siehe Text.

Verändert übernommen nach Palmer 2005 [50].

Studien von Schreiber et al. (2006) haben ergeben, dass  $TatA_d$  aus *B. subtilis* eine geringe Halbwertszeit aufweist, die Vermutung liegt daher nahe, dass ein  $TatA$ -Protein nur für einen Translokationszyklus verwendet und danach von der Zelle degradiert wird [51].

Die Energetisierung des Zwillings-Arginin-Wegs erfolgt über den elektrochemischen Gradienten der Membran. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass das Tat-Translokationssystem unabhängig von NTPs (wie ATP oder GTP) funktioniert [12], andererseits konnte über den Translokationszyklus hinweg ein Abbau des Protonengradienten beobachtet werden [52]. Daher wurde für die Energetisierung dieses Wegs ein Protein/Protonen-Antiporter-Mechanismus vorgeschlagen [53].

### 1.2.7. Qualitätskontrolle des Tat-Apparats

Die Tatsache, dass Tat-Substrate in gefalteter nativer Form exportiert werden, steht fest. Da in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass inkorrekt gefaltete Proteine von dem Tat-abhängigen Transport ausgeschlossen werden, wurde vorgeschlagen, dass der Tat-Apparat ein System zur Qualitätskontrolle besitzen muss [54]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Cytochrom *c* nur kompatibel für den Tat-abhängigen Transport ist, wenn zuvor, im Cytoplasma, der Häm-Kofaktor in das Apoprotein eingefügt wurde [55]. Ein anderes Beispiel bildet die heterooligomere Hydrogenase 2 aus *E. coli*, deren kleine Untereinheit trotz ihres Tat-Signalpeptids nur dann transloziert wurde, wenn sie mit der größeren, keine Signalsequenz enthaltenden Untereinheit, zu einem Komplex assembliert war [56]. Wie die Erkennung der inkorrekt gefalteten oder unvollständigen Substrate durch die Tat-Translokase funktioniert, ist jedoch bisher noch unklar.

Zusätzlich zu dieser "Proofreading"-Fähigkeit des Tat-Apparats spielen in einigen Fällen substrat-spezifische Chaperone eine Rolle. Diese auch REMPs (von: *redox enzyme maturation protein*) genannten Helferproteine binden an die Signalpeptide bestimmter Tat-Substrate und bewahren diese vor der Interaktion mit der Tat-Translokase bevor sie ihren Kofaktor eingefügt oder sich zu einem Komplex zusammengelagert haben [57]. Die Gene dieser Chaperon-Proteine sind oft in einem Operon mit dem jeweiligen Substrat-Protein lokalisiert [38]. Zwei Beispiele stellen die homologen Proteine DmsD und TorD dar, die in *E. coli* als spezifische Chaperone für die DMSO-Reduktase bzw. für die TMAO-Reduktase gefunden wurden. Beide Helferproteine binden sowohl an die Tat-Signalpeptide als auch an die bereits gefalteten reifen Bereiche der noch ohne Kofaktor vorliegenden Apoproteine. Das Signalpeptid der Substratproteine ist durch die Bindung des Helferproteins blockiert und kann nicht mit dem Translokationsapparat interagieren. Eine Bindung des Kofaktors verdrängt vermutlich das REMP, wodurch die Translokation des nun vollständigen Tat-Substrats möglich wird [2].

Ein anderes REMP, das HybE-Protein, ist strukturell nicht mit DmsD und TorD verwandt. Dieses Protein stellt sicher, dass die aus zwei Untereinheiten bestehende Hydrogenase-2 in kompletter Form transportiert wird, in seiner Abwesenheit wird nur eine der Untereinheiten ohne seinen Partner exportiert [58].

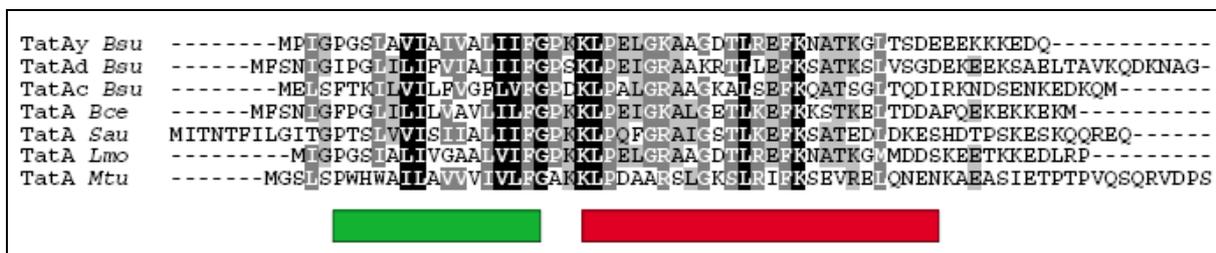
Da beobachtet wurde, dass das REMP DmsD mit dem TatBC-Rezeptorkomplex wechselwirken kann [59], ist die Möglichkeit denkbar, dass diese Signalpeptid-bindenden Chaperone zudem die Funktion haben könnten, das Tat-Substrat zum Translokationsapparat zu eskortieren.

### 1.2.8. Das Tat-abhängige Translokationssystem in *B. subtilis* und anderen Gram-positiven Bakterien

In *B. subtilis* und fast allen anderen Gram-positiven Bakterien (die einzige bekannte Ausnahme bildet *Streptomyces* [60]) fehlt ein TatB-homologes Protein. Eine „Minimalausstattung“ aus einem TatA/TatC-Paar hat sich als funktionell erwiesen [4]. Das Genom von *B. subtilis* kodiert für zwei TatC und drei TatA-Kopien. Die Proteine TatA<sub>d</sub> und TatC<sub>d</sub> werden mit ihrem Substrat, der sekretorischen Phosphodiesterase (PhoD) auf einem Operon kodiert und bei Bedarf, Phosphatknappheit im Medium, koexprimiert. Ein anderes Tat-Proteinpaar TatA<sub>y</sub>/TatC<sub>y</sub> ist für den Transport des Proteins YwbN zuständig und ihre Gene sind ebenfalls auf einem Operon kodiert. Das dritte TatA<sub>C</sub>-Protein steht allein, seine Funktion ist bisher ungeklärt. Die multiplen TatA/TatC-Paare Gram-positiver Bakterien scheinen also ihre spezifischen Substrate zu besitzen [61].

### 1.2.9. Die doppelte Funktion von TatA in Gram-positiven Bakterien

Die TatA-Proteine aus *B. subtilis* und anderen Gram-positiven Bakterien zeigen sowohl sequenzielle Ähnlichkeit zu TatA als auch zu TatB aus *E. coli* [1]. TatA aus *E. coli* besitzt ein hochkonserviertes Phe-Gly (FG)-Motiv, wohingegen TatB ein Gly-Pro (GP)-Motiv am Ende des N-terminalen Segments aufweist. Die TatA-Proteine Gram-positiver Bakterien aus TatA/C-Systemen hingegen weisen an dieser Stelle eine Mischung, ein FGP-Motiv auf (siehe Abb. 5) [62].



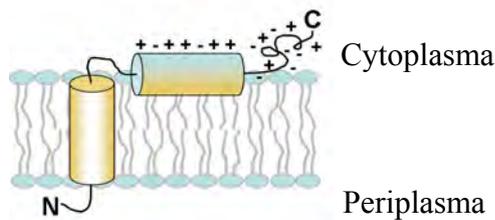
**Abb. 5:** Aufreihung der TatA-Sequenzen aus TatA/C-Systemen Gram-positiver Bakterien: aus *Bacillus subtilis* (Bsu), *Bacillus cereus* (Bce), *Staphylococcus aureus* (Sau), *Listeria monocytogenes* (Lmo) und *Mycobacterium tuberculosis* (Mtu). Der Grad der Konservierung der Aminosäuren ist durch graues Hinterlegen markiert, mit Schwarz als am höchsten konservierte Positionen. Die vorhergesagten Bereiche für die Transmembranhelix (grün) und die amphiphile Helix (rot) sind gezeigt. Verändert übernommen von Jongbloed et al. 2006 [62]

Da gezeigt wurde, dass die multiplen TatA/C-Systeme ohne eine TatB-Komponente auskommen und funktionell sind, wird vorgeschlagen, dass die TatA-Proteine der TatA/C-

Systeme, von den Autoren als  $\text{TatA}^+$  bezeichnet, eine Art Mischung aus TatA und TatB aus *E. coli* oder Thylakoiden darstellen und die Funktion beider Proteine übernehmen.

### 1.2.10. $\text{TatA}_d$ aus *Bacillus subtilis*

$\text{TatA}_d$  aus *B. subtilis*, welches in dieser Arbeit untersucht wird, ist ein 70 Aminosäuren langes Membranprotein. Abb. 6 zeigt die Primärsequenz und die vorhergesagte Topologie des Proteins (vgl. auch Abb. 2).



```
MFSNIGIPGLLILIFVIALIIFGPSKLPEIGRAAGRLLLEFKSATKSLVSGDEKEEKS AELTAVKQDKNAG
```

**Abb. 6:** Sequenz und vorhergesagte Topologie von  $\text{TatA}_d$  aus *B. subtilis*.

Eine Besonderheit von  $\text{TatA}_d$  ist, dass es (im Gegensatz zu TatA aus *E. coli* und Tha4 aus Thylakoiden) neben seiner membranständigen Lokalisierung auch löslich im Cytoplasma gefunden wurde. Hier scheint es mizellenartige Strukturen auszubilden, in denen sich die N-terminalen  $\alpha$ -Helices zu einem hydrophoben Kern zusammenlagern und die geladene hydrophile Region, wie bei einer Detergenzmizelle, nach außen zeigt. Zudem konnte durch Ko-Immunoprecipitierung mit PhoD-Antikörpern gezeigt werden, dass lösliches  $\text{TatA}_d$  im Cytosol Wechselwirkungen mit seinem Substrat PhoD eingeht [63]. Pop et al. folgerten daraus, dass  $\text{TatA}_d$  die Funktion eines *Targeting*-Faktors übernehmen könnte, welcher das Substrat zum Translokon geleitet, wo es von spezifischen Bindungsstellen in  $\text{TatC}_d$  erkannt und übernommen wird.



---

### 1.3. Strukturaufklärung von Membranproteinen

Strukturaufklärung ist nicht nur im Fall von TatA für den Mechanismus der Tat-abhängigen Translokation von großer Bedeutung. Die Strukturaufklärung von Membranproteinen allgemein ist ein wichtiges, sich schnell entwickelndes Gebiet. Etwa 30% aller Strukturgene eines typischen Genoms kodieren für Membranproteine [64]. Jedoch weniger als eine von 500 der aufgeklärten Strukturen in den Datenbanken stammen von einem Protein dieser essentiellen Proteinklasse. Membranproteine spielen Schlüsselrollen in wichtigen biologischen Prozessen. Sie dienen beispielsweise als Rezeptoren, Membrankanäle, Transporter, Zelladhäsionsmoleküle und Enzyme. Ihr Ausfall ist oft mit Krankheiten verbunden, weshalb Kenntnisse über ihre dreidimensionale Struktur auch von pharmazeutischem Interesse sind.

Klassische etablierte Methoden für die atomar aufgelöste Strukturaufklärung sind die Röntgenkristallographie und die Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie. Viele lösliche globuläre Proteine wurden mit Hilfe dieser zwei Techniken aufgeklärt und ihre Struktur ist in Datenbanken hinterlegt. Beide Methoden sind jedoch aufgrund ihrer Anforderungen an die Probenvorbereitung für Membranproteine problematisch. Für die Röntgenkristallographie ist es nötig, genügend große Kristalle der zu untersuchenden Proteine zu erhalten, was für hydrophobe Membranproteine nur in den seltensten Fällen möglich ist.

Die Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie erfordert gut lösliche Probenmoleküle, die sich durch schnelle Bewegungen isotrop reorientieren und zu Signalen mit schmalen Linienbreiten führen. Membranproteine sind meist unlöslich, neigen zur Aggregation und besitzen ihre native Konformation nur in einer Membranumgebung. Dies erschwert aufgrund der verlängerten Korrelationszeiten (die Zeit der Reorientierung der Moleküle in Lösung) die Flüssigkeits-NMR-Messungen oder macht sie gar unmöglich. Nur in einigen Einzelfällen konnte bislang die Struktur von Membranproteinen in Detergenz-Mizellen oder kleinen Lipid-Bizellen bei höheren Temperaturen untersucht werden.

Idealerweise werden Membranproteine jedoch in einer möglichst natürlichen Umgebung, z.B. einer Modellmembran aus Phospholipiddoppelschichten untersucht. Dies ist mittels Techniken wie Circular dichroismus (CD), orientiertem Circular dichroismus (OCD) und Elektronenmikroskopie möglich. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie an Membranproteinen in Lipid-Vesikeln kann man Informationen über vorhandene Sekundärstrukturanteile erhalten. Die neuere, orientierte Variante dieser Technik, die OCD-Spektroskopie, wird an Membranproteinen in orientierten Phospholipiddoppelschichten durchgeführt. Sie liefert zudem Informationen über die Topologie des Proteins, d. h. die Ausrichtung seiner

$\alpha$ -helikalen Domänen in der Membran. Mit der Elektronenmikroskopie lassen sich dreidimensionale Bilder mit einer Auflösung im Nanometerbereich erzielen [65,66].

Die Möglichkeit, atomare Auflösung der Struktur von Membranproteinen in einer Phospholipid-Umgebung zu erzielen, bietet die Festkörper-NMR-Spektroskopie. Diese Technik nutzt im Gegensatz zur Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie die reduzierte Beweglichkeit der Membranproteine in ihrer Lipidumgebung gezielt aus, um durch Messung der anisotropen Wechselwirkungen Strukturinformationen über das System zu erlangen. Moderne zweidimensionale Techniken wie das PISEMA (bzw. das neuere SAMMY-Experiment) liefern hochaufgelöste NMR-Spektren, die sowohl detaillierte Informationen über Sekundärstrukturen als auch über die Topologie des Proteins, wie Helixlänge, Neigung und Drehrichtung, in der Membran liefern. Diese Strukturanalyse stellt einen wichtigen Schritt auf dem Weg zu einer atomar aufgelösten vollständigen Struktur dar, und lässt bereits Schlüsse über bestimmte biologische Systeme oder Modellmechanismen zu.

Im Folgenden sollen diese, in der vorliegenden Arbeit verwendeten, Methoden näher erläutert werden.

### **1.3.1. Modellsysteme für die Strukturuntersuchung von Membranproteinen**

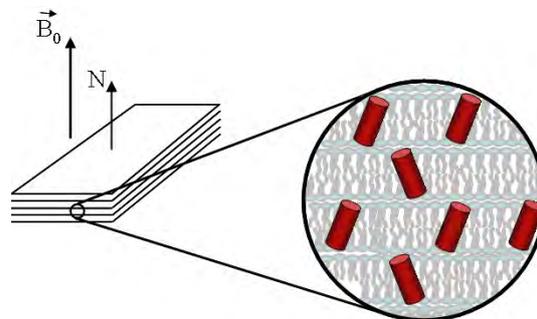
Membranproteine nehmen ihre biologisch relevante Konformation oft nur in einer Umgebung ein, die eine natürliche Membran imitiert, z. B. eine Modellmembran aus synthetischen Lipiden. Daher muss besonderer Wert auf die Probenvorbereitung gelegt werden, in der geeignete Bedingungen wie pH-Wert, Konzentration, Temperatur, Puffer, Gegenionen, Art der Lipide oder Detergenzien für das jeweilige Protein gefunden werden müssen. Die Schwierigkeit der Strukturaufklärung von Membranproteinen liegt nicht zuletzt darin, stabile homogene und strukturell relevante Proben herzustellen, mit denen hochaufgelöste Spektren erhalten werden können.

Als membranimitierende Umgebungen eignen sich prinzipiell Mizellen, Vesikel, Bizellen und orientierte Phospholipiddoppelschichten. Detergenz- und Lipidmoleküle lagern sich in Anwesenheit von Wasser aufgrund ihrer amphiphilen Natur zu diesen Strukturen spontan zusammen, in denen die hydrophoben Reste der Moleküle in einen hydrophoben Kern bilden, während die hydrophilen Kopfgruppen nach außen, in Richtung der wässrigen Phase zeigen. In diese Biomembran-imitierenden Strukturen können Membranproteine eingebettet werden. Je nach Anforderungen der Meßmethode an Dynamik und Orientierung der Probe kann ein bestimmtes System gewählt werden.

Detergenz-Mizellen sind die kleinsten und beweglichsten membranimitierenden Einheiten und können daher für die Flüssig-NMR-Spektroskopie verwendet werden. Hierbei haben sich Mizellen aus SDS (Natriumdodecylsulfat) und dem Lyso-Phospholipid LPPG (1-Palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-[phospho-RAC-(1-glycerol)]) als besonders geeignet erwiesen [67,68]. Für die CD-Spektroskopie können sowohl proteinhaltige Detergenz-Mizellen als auch Lipidvesikel verwendet werden. Die Vesikel können aus zwitterionischen Lipiden (z. B. DMPC, 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin) oder aus Mischungen mit anionischen Lipiden (z. B. DMPG, 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)]) hergestellt werden.

Für die OCD-Spektroskopie und für wichtige Experimente der Festkörper-NMR-Spektroskopie werden uniaxial orientierte Proben benötigt. Phospholipiddoppelschichten, welche flüssigkristalline Bioaggregate darstellen, eignen sich intrinsisch gut als Proben für derartige orientierungsabhängige Studien. Prinzipiell werden zwei Arten uniaxial orientierter Lipid-Proben für die Strukturaufklärung verwendet: mechanisch orientierte Phospholipiddoppelschichten und magnetisch orientierte Bizellen.

Mechanisch orientierte Lipid-Proben (z. B. aus DMPC) lassen sich mit Hilfe von Glasplättchen herstellen. Hierzu trägt man die Lipide gemischt mit dem Membranprotein, entweder kosolubilisiert in organischem Lösungsmittel oder in Form von Proteoliposomen, auf eine Glasoberfläche auf, so dass sich nach der Trocknung ein Lipid-Protein-Film bildet. Beim Hydratisieren der Probe in einer Atmosphäre mit kontrollierter Luftfeuchtigkeit (97%) bilden sich dann Membranen, die parallel zur Glasoberfläche ausgerichtet sind. Für die Festkörper-NMR-Spektroskopie werden mehrere beschichtete Glasplättchen gestapelt, um die Signalintensität zu erhöhen (siehe Abb. 8). Für OCD-Messungen werden Phospholipiddoppelschichten auf einem einzelnen Quarzglas-Fenster orientiert.



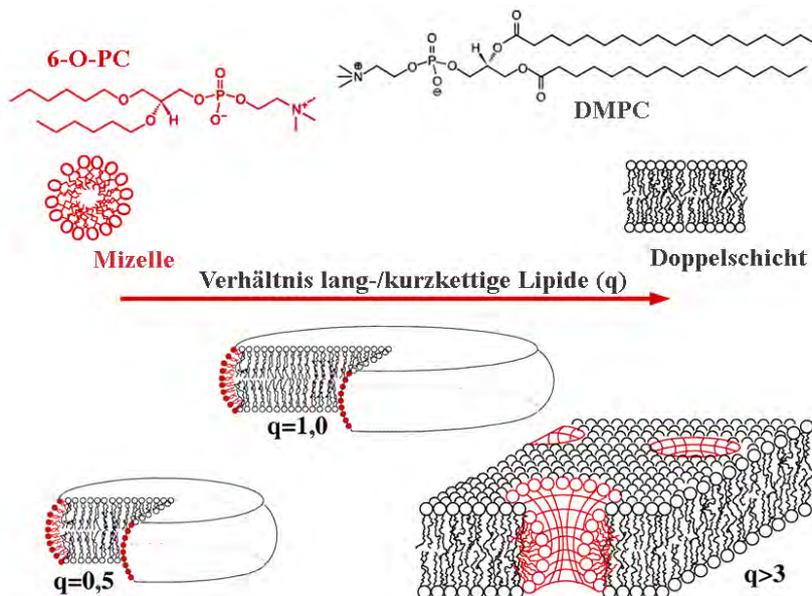
**Abb. 8.** Orientierte Probe für die Festkörper-NMR-Spektroskopie. Proteinhaltige Phospholipiddoppelschichten werden an Glasplättchen mechanisch orientiert und anschließend gestapelt.

Bizellen sind Aggregate aus langkettigen Lipiden (z. B. DMPC) und kurzkettigen Lipiden (z. B. DHPC oder, die stabilere etherverknüpfte Variante 6-O-PC) oder Detergenzien in wässriger Lösung. Die langkettigen Lipide bilden eine Doppelschicht aus, die von den kurzkettigen Lipiden an den Rändern abgeschlossen wird (siehe Abb. 9). Bizellen bilden

lyotrop flüssigkristalline Lösungen, die über der Phasenübergangstemperatur des langkettigen Lipids eine nematische magnetisch ausrichtbare Phase ausbilden. Enzyme können ihre biologische Aktivität in Bizellen beibehalten [69], was zeigt, dass diese Systeme physiologisch relevante Modellumgebungen für Membranproteine darstellen.

Die Eigenschaften von Bizellen hängen stark von ihrer Zusammensetzung ab. Eine charakteristische Größe ist daher das Verhältnis  $q = \text{langkettige Lipide/kurzkettige Lipide}$ . Während Bizellen mit  $q < 1,5$  sich schnell bewegende Scheiben bilden (siehe Abb. 9) (isotrope Bizellen) bilden Bizellen mit  $q > 2,5$  und Lipidkonzentrationen zwischen 5 und 40% über ihrer Übergangstemperatur eine stabile Schicht, die sich in einem starken Magnetfeld mit ihrer Normalen senkrecht zu diesem ausrichtet (*perpendicular bicelles*) [70]. Die Ausrichtung der Bizellen im Magnetfeld kann durch Zugabe von Lanthanoid-Ionen (z. B.  $\text{Yb}^{3+}$ ) um  $90^\circ$  gedreht werden (*flipped bicelles*) [71].

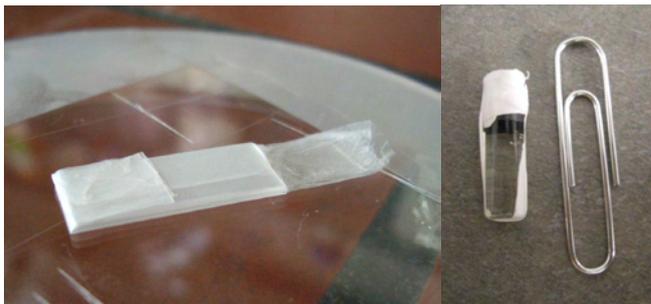
Die Morphologie der magnetisch ausrichtbaren Bizellenphase wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Während man früher von scheibenförmigen Aggregaten (*discs*) ausging, wird diese Struktur nun nur noch für die isotrope Phase, für Bizellen mit kleinerem  $q$  und bei niedrigen Temperaturen angenommen. Für  $q > 2,5$ , also für die für die NMR-Spektroskopie relevante Phase schlagen van Dam et al. perforierte lamellare Schichten („*swiss cheese*“) vor [72]. Von Harraun et al. wurden hingegen „wurmartige“ Strukturen gefunden [73].



**Abb. 9:** Makromolekulare Strukturen, die sich je nach Verhältnis der Lipidkomponenten 6-O-PC und DMPC spontan in wässriger Phase ausbilden: Mizellen, Bizellen und Lipiddoppelschichten. Abbildung verändert übernommen von Prosser et al. [74].

Die Verwendung magnetisch orientierter Bizellen für die Festkörper-NMR-Spektroskopie hat gegenüber der Verwendung mechanisch orientierter Membranen einige Vorteile. Bizellenproben sind einfacher herzustellen, es kann mehr Proteinmaterial verwendet werden, die Probe ist homogener, da keine Glasplättchen Platz im Probenvolumen einnehmen und die Probe ist stabiler, da sie fest verschlossen werden kann und so vor dem Austrocknen geschützt wird. Da Bizellen wässrige Lösungen darstellen, kann man von einer vollständigen Hydratisierung der Lipide ausgehen. Des Weiteren kann durch die runde Probenform eine effektive Solenoid-Rundspule verwendet werden, und die Linien der NMR-Spektren sind aufgrund ihrer Beweglichkeit im Allgemeinen besser aufgelöst (siehe Abschnitt 1.3.3.2.).

Für Peptide oder Proteinfragmente, die nur eine amphiphile Helix als Sekundärstrukturelement enthalten, sind jedoch Phospholipiddoppelschichten besser geeignet als Bizellen. Solche Peptide könnten sich an die kurzkettigen Lipide der Bizellenränder anlagern, was zu einer nicht aussagekräftigen Struktur führen würde.



**Abb. 10:** Orientierte Proben für die Festkörper-NMR-Spektroskopie. (A) Stapel aus Glasplättchen mit orientierten Phospholipiddoppelschichten (B) Bizellen-Lösung.

### 1.3.2. OCD-Spektroskopie

Die OCD-Spektroskopie ist eine Variante der CD-Spektroskopie in der orientierungsabhängige Parameter gemessen werden können. Diese Methode ist speziell für die Untersuchung der Topologie  $\alpha$ -helikaler Membranproteine (der überwiegende Großteil aller Membranproteine besitzt  $\alpha$ -helikale Struktur [75]) von großem Nutzen.

Sie beruht darauf, dass bestimmte elektronische Übergänge in einer  $\alpha$ -Helix parallel zur Helixachse polarisiert sind, und die Stärke der Absorption von verschieden zirkular polarisiertem Licht daher von der Orientierung der Helix bezüglich der Lichtquelle abhängig ist. Dieser Umstand wurde von Moffit bereits 1956 vorhergesagt [76] und hat zu der Entwicklung des orientierten Circular dichroismus geführt [77].

In CD- und OCD-Spektren wird die Elliptizität optisch aktiver Substanzen in Abhängigkeit von der Wellenlänge gemessen. Die Elliptizität ist proportional zur Differenz der Absorption von rechts- und links-zirkularpolarisiertem Licht. Dieser Absorptionsunterschied kommt (bei Proteinen) durch die Nachbarschaft des chiralen  $C_{\alpha}$ -Atoms der Peptidbindung zustande. Im fernen UV-Spektralbereich zwischen 260-180 nm werden in einem Peptid vor allem  $n-\pi^*$  und  $\pi-\pi^*$ -Übergänge der Amidbindungen beobachtet.

In einer  $\alpha$ -Helix bilden sich zwischen den N-H- und C=O-Gruppen übereinander angeordneter Peptidbindungen Wasserstoffbrücken aus, so dass eine spiralförmige Struktur entsteht, in welcher das jeweilige C=O-Dipolmoment entlang der Helixachse gerichtet ist. Es bilden sich für die jeweiligen elektronischen Übergänge Übergangsdipolmomente parallel oder senkrecht zur Helixachse aus.

Die Stärke der Absorption der Übergänge hängt nun davon ab, in welchem Winkel der elektrische Feldvektor des eingestrahlten Lichts relativ zum Übergangsdipolmoment der betreffenden Bindungorbitale eintrifft und in Wechselwirkung treten kann.

Durch dieses Phänomen kann in einer uniaxial orientierten Probe eine  $\alpha$ -Helix, die die Membran senkrecht durchspannt (*I-state*, von *inserted state*) leicht von einer flach auf der Oberfläche aufliegenden  $\alpha$ -Helix (*S-state*, von *surface state*) unterschieden werden. Tabelle 1 fasst die für die OCD relevanten elektronischen Übergänge zusammen [77].

**Tabelle 1:** Parameter der CD-Banden von  $\alpha$ -Helices. Verändert übernommen von Wu et al. (1990) [77].

CD-Bande	Wellenlänge der Bande / nm	Vorzeichen der Bande	Linienbreite / nm
$n-\pi^*$ <i>S-state</i>	222,3	negativ	12,9
$n-\pi^*$ <i>I-state</i>	224,9	negativ	11,9
$\pi-\pi^*$ <i>S-state</i>	204,8	negativ	7,4
	190,4	positiv	6,4
$\pi-\pi^*$ <i>I-state</i>	188,5	negativ	10,1

Die Probenhalterung, auf welcher die OCD-Zelle im Probenraum des Spektrometers fixiert wird, ist um den Messstrahl rotierbar. Zur Ausmittlung von spektralen Artefakten, die durch linearen Dichroismus und Doppelbrechung der Probe erhalten werden können, wird die Probe unter 8 verschiedenen Rotationswinkeln vermessen. Außerdem sind die Luftfeuchtigkeit und die Temperatur in der Probenkammer kontrollierbar, so dass eine vollständig hydratisierte Membran über ihrer Phasenübergangstemperatur gewährleistet werden kann.

---

Die Auswertung der OCD-Spektren erfolgt, wie bei der CD-Spektroskopie, durch Vergleich mit empirisch ermittelten, charakteristischen Spektren strukturbekannter Modell-Peptide (siehe Abb. 40, Abschn. 4.3.) und durch Auswertungsalgorithmen, welche die experimentellen Linienformen durch gewichtete Kombination der Banden reiner Sekundärstrukturelemente anpassen.

Die OCD-Spektroskopie liefert globale Information über die zeitlich gemittelte Summe aller Sekundärstrukturen in einem Protein und dessen Orientierung in Lipid-Modellmembranen. Sie gibt, verglichen mit der NMR-Spektroskopie, weniger detaillierte Auskünfte, ist jedoch weit weniger aufwändig und billiger. Es können kleinere Mengen an Protein verwendet werden, und das Protein muss nicht isotopenmarkiert vorliegen.

### **1.3.3. Festkörper-NMR-Spektroskopie**

Mit der Festkörper-Resonanzspektroskopie lassen sich, im Gegensatz zur klassischen NMR-Spektroskopie in Flüssigkeit, anisotrope Spin-Wechselwirkungen untersuchen. Da die fehlende Ausmittlung dieser Anisotropien im Festkörper zu sehr breiten Linien (im kHz-Bereich) führt, wurden verschiedene Techniken zur Linienverschmälerung und Erleichterung der Interpretierbarkeit der Spektren, ohne Verlust des Informationsgehalts, entwickelt.

Eine Möglichkeit ist das *Magic-Angle-Spinning* (MAS), in dem die Probe im kHz-Bereich mechanisch um den magischen Winkel (siehe Abschn. 1.3.3.1.4.) gedreht wird und so die Resonanzlinien durch Ausmittlung orientierungsabhängiger Parameter verschmälert werden. Mehrere Methoden wurden auf MAS basierend entwickelt, die es ermöglichen internukleare Distanzen in Biomolekülen zu messen [78,79,80].

Ein anderer Ansatz ist (wie oben bereits erwähnt) die Verwendung von uniaxial orientierten Proben (statische Festkörper-NMR-Spektroskopie). Durch eine definierte spezifische Orientierung der Proteinmoleküle bezüglich des Magnetfelds, werden relativ scharfe Linien ohne Verlust der anisotropen Strukturinformation erhalten.

Zum besseren Verständnis sollen zunächst einige theoretische Grundlagen der Festkörper-NMR-Spektroskopie kurz erläutert werden.

Technische Details und Aufnahmetechniken (Pulssequenzen, Kreuzpolarisation, Hochleistungsentkopplung) werden im Materialteil in Abschn. 3.3.8.1. besprochen.

### 1.3.3.1. Theoretische Grundlagen der Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie beruht auf der Wechselwirkung von magnetischen Dipolmomenten der Atomkerne einer Probe mit lokalen und äußeren Magnetfeldern. Das magnetische Moment  $\mu$  eines Kerns wird durch seinen Kernspin, eine quantenmechanische Eigenschaft, die als Eigendrehimpuls eines Kerns interpretiert werden kann, verursacht. Nicht jeder Atomkern hat einen Kernspin (dies ist abhängig von der Anzahl seiner Neutronen und Protonen), und die Stärke der Wechselwirkungen ist durch das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$  gegeben.

Für die Biologie, speziell für die Strukturaufklärung von Membranproteinen, sind vor allem die Kerne  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$  von Bedeutung ( $^1\text{H}$  ist zu ubiquitär und daher kaum aufzulösen und zu interpretieren). Aufgrund ihrer geringen natürlichen Häufigkeit und ihrem kleinen gyromagnetischen Verhältnis, was einer geringen Empfindlichkeit entspricht, werden die Isotope  $^{15}\text{N}$  oder  $^{13}\text{C}$  oft in dem zu untersuchenden Protein angereichert. Um lokale Strukturinformationen zu erhalten oder die Zuordnung der NMR-Signale zu erleichtern, werden die Proteine zudem oft an bestimmten Stellen selektiv markiert.

Tabelle 2 zeigt einige Eigenschaften der für die Strukturbiologie relevanten Isotope [81].

**Tabelle 2:** Eigenschaften einiger für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie wichtiger Atomkerne. Die NMR-Nachweisempfindlichkeit wird relativ zu der des  $^1\text{H}$ -Kerns angesetzt.

Isotop	Kernspin-Quantenzahl I	gyromagnetisches Verhältnis $\gamma / \text{T}^{-1}\text{s}^{-1}$	natürliche Häufigkeit / %	relative Empfindlichkeit / %
$^1\text{H}$	$\frac{1}{2}$	$2,6752 \cdot 10^8$	99,985	100 %
$^2\text{H}$	1	$4,1065 \cdot 10^7$	0,015	0,96 %
$^{13}\text{C}$	$\frac{1}{2}$	$6,7266 \cdot 10^7$	1,11	1,59 %
$^{15}\text{N}$	$\frac{1}{2}$	$-2,7108 \cdot 10^7$	0,37	0,1 %
$^{31}\text{P}$	$\frac{1}{2}$	$1,0829 \cdot 10^8$	100	6,63 %

#### 1.3.3.1.1. Spinwechselwirkungen im Festkörper

Die Wechselwirkung der Kernspins (bzw. der durch sie verursachten magnetischen Momente) mit einem äußeren statischen Magnetfeld wird als **Zeeman-Wechselwirkung** bezeichnet.

Weitere Wechselwirkungen mit Proben-internen Magnetfeldern sind die **chemische Verschiebung** (Wechselwirkung mit Feldern der Elektronenhülle des Moleküls), die **dipolare Kopplung** (Wechselwirkung mit anderen Kernspins der näheren Umgebung über den Raum), die **J-Kopplung** (Wechselwirkung mit anderen Kernspins, über die Elektronen einer

Molekülbindung vermittelt) und die **quadrupolare Kopplung** (Wechselwirkung des elektrischen Quadrupolmoment des Kerns mit einem elektrischen Feldgradienten, die bei Kernen mit Spin-Quantenzahl größer  $\frac{1}{2}$  durch nicht-sphärische Ladungsverteilung im Kern verursacht wird).

Tabelle 3 fasst die Eigenschaften dieser Spinwechselwirkungen im Festkörper zusammen [82,83].

**Tabelle 3:** Eigenschaften verschiedener Spin-Wechselwirkungen.

Wechselwirkung	Verursachung	Abhängigkeit von $B_0$	Sichtbar in Flüssigkeiten	Linienbreite
Zeeman	äußeres statisches Magnetfeld	Ja	ja	bis $10^9$
chemische Verschiebung	elektronische Umgebung	Ja	ja	bis $10^5$
dipolare Kopplung	WW mit anderen Spins über den Raum	Nein	nein	bis $10^5$
J-Kopplung	WW mit anderen Spins über Bindungen	Nein	ja	bis $10^2$
quadrupolare Kopplung	elektrisches Quadrupolmoment	nein (in 1. Näherung)	nein	bis $10^9$

Da J-Kopplungen aufgrund ihrer geringen Stärke im Festkörper von anderen Wechselwirkungen überlagert werden und daher nicht sichtbar sind, werden sie hier nicht näher erläutert. Auch auf die Quadrupol-Kopplung soll hier nicht eingegangen werden, da sie in den in dieser Arbeit gemessenen Kernen nicht vorkommt.

Eine ausführliche und quantitative Beschreibung der Spinwechselwirkungen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, daher sollen sie im Folgenden nur knapp erläutert werden.

### 1.3.3.1.2. Die Zeeman-Wechselwirkung

In einem äußeren statischen Magnetfeld  $B_0$  spalten sich die zuvor entarteten Energiezustände der Kernspins in diskrete Energieniveaus auf, die von den Kernspins entsprechend der Boltzmannverteilung besetzt werden. Ein Spin mit der Drehimpulsquantenzahl  $I = \frac{1}{2}$  kann beispielsweise zwei Energieniveaus besetzen, deren Energiedifferenz  $\Delta E$  proportional zu der Magnetfeldstärke ist:

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0 = \hbar\omega_0 \quad < 1 >$$

$\hbar$  ist in dieser Formel das durch  $2\pi$  geteilte Planksche Wirkungsquantum und  $\gamma$  das gyromagnetische Verhältnis des Kerns.  $\omega_0$  wird Larmorfrequenz genannt und ist die Winkelgeschwindigkeit, mit der die Magnetisierung um das statische Magnetfeld präzediert.

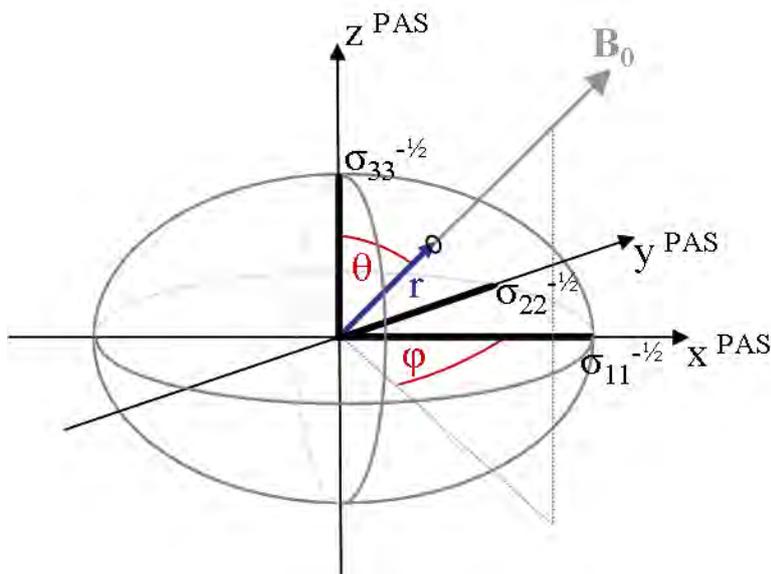
Zur Betrachtung von Spinwechselwirkungen ist es zum Zwecke der Vereinfachung üblich, ein rotierendes Koordinatensystem zu verwenden, welches mit der Larmorfrequenz rotiert, so dass die Magnetisierung in diesem System als statisch betrachtet werden kann.

Wird ein oszillierendes  $B_1$ -Feld (in Form einer elektromagnetischen Radiofrequenzwelle) mit der Larmorfrequenz senkrecht zu  $B_0$  eingestrahlt, so können die Spins mit dem Magnetfeldvektor dieser, die Resonanzbedingung erfüllenden Strahlung in Wechselwirkung treten. Die (im rotierenden Koordinatensystem) vorher in z-Richtung zeigende Magnetisierung wird im einfachsten Fall durch ein (im rotierenden System statisches)  $B_1$ -Feld geeigneter Dauer, einem so genannten  $90^\circ$ -Puls, in die x-y-Ebene "geklappt", wo sie dann durch Induktion ein messbares Signal in der NMR-Spule erzeugt.

#### 1.3.3.1.3. Die chemische Verschiebung

Die Elektronen, die jeden Atomkern umgeben treten ebenfalls mit dem äußeren Magnetfeld  $B_0$  in Wechselwirkung, nehmen bestimmte Bewegungszustände an, und induzieren so ihrerseits lokale Magnetfelder. Dadurch wird das äußere Feld am Ort des Kerns je nach Molekülgeometrie und Elektronendichte, also je nach chemischer Umgebung, verstärkt oder abgeschwächt. Die Resonanzfrequenzen der Kernspins werden durch diese Wechselwirkungen verschoben, ein Effekt, den man als chemische Verschiebung bezeichnet. Da die chemische Verschiebung wesentlich kleiner als die Zeemann-Aufspaltung ist, wird sie in Millionstel der Larmorfrequenz (ppm, für *parts per million*) angegeben.

Die Orientierungsabhängigkeit der chemischen Verschiebung lässt sich durch einen Tensor beschreiben, der in einem gegebenen Koordinatensystem mathematisch durch eine  $3 \times 3$ -Matrix ausgedrückt und durch einen Ellipsoid veranschaulicht werden kann. Dieser Chemische Verschiebungs-Tensor (auch CSA-Tensor, von *chemical shift anisotropy*) kann zur einfacheren mathematischen Betrachtung in einem Koordinatensystem beschrieben werden, in welchem alle Tensorelemente außer den drei Diagonalelementen Null sind. (Anschaulich heißt das, dass in diesem Koordinatensystem die Hauptachsen des Ellipsoids mit den Koordinatenachsen zusammenfallen). Dieses spezielle Koordinatensystem, das Hauptachsensystem (PAS, von *principal axes system*), ist für jeden Kern im Molekül mit seiner speziellen chemischen Umgebung charakteristisch. In Abb. 11 ist ein CSA-Tensor in seinem Hauptachsensystem in Form eines Ellipsoids dargestellt.

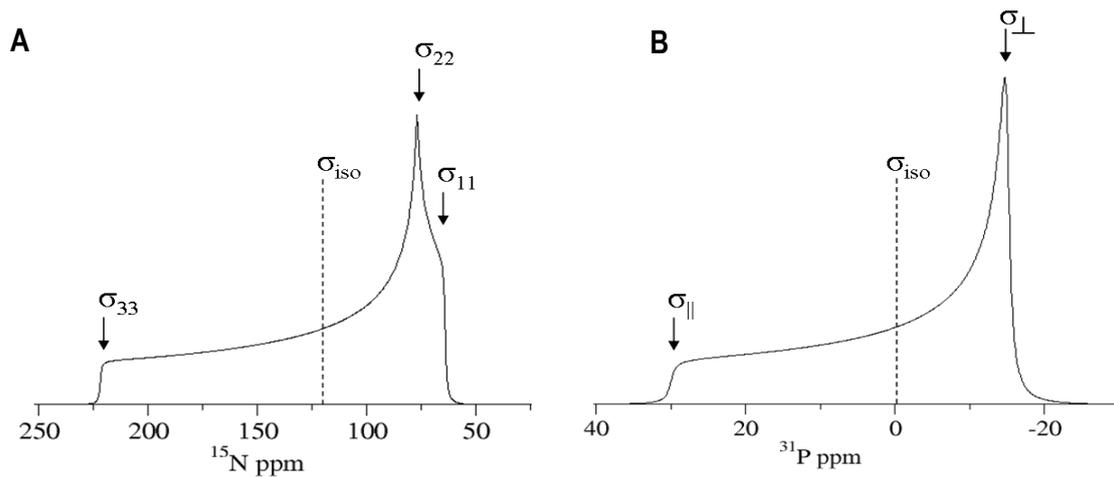


**Abb. 11:** Modell eines CSA-Tensors. Die Orientierung des Tensors bezüglich des Magnetfelds  $B_0$  ist durch die Winkel  $\theta$  und  $\varphi$  gegeben.

Für die Tensorelemente gilt:  $\sigma_{11}^{PAS} \leq \sigma_{22}^{PAS} \leq \sigma_{33}^{PAS}$ , wobei  $\sigma_{33}^{PAS}$  das am schwächsten abgeschirmte Element mit der höchsten Resonanzfrequenz und der größten chemischen Verschiebung (links im Spektrum) und  $\sigma_{11}^{PAS}$  das am stärksten abgeschirmte Element mit der niedrigsten Resonanzfrequenz und der kleinsten chemischen Verschiebung (rechts im Spektrum) ist. Im PAS-System liegt der Magnetfeldvektor  $B_0$  nun nicht mehr unbedingt in z-Richtung. Die chemische Verschiebung  $\sigma_{zz}$  in der relevanten gemessenen Richtung, parallel zu  $B_0$ , wird durch den Vektor  $r$  dargestellt, dessen Länge durch den Tensor definiert ist ( $\sigma_{zz} = 1/r^2$ ). Diese im Spektrum beobachtete chemische Verschiebung  $\sigma_{zz}$  berechnet sich in Abhängigkeit der Polarkoordinaten und zu [84]:

$$\sigma_{zz} = (\sin^2 \theta \cos^2 \varphi) \sigma_{11} + (\sin^2 \theta \sin^2 \varphi) \sigma_{22} + (\cos^2 \theta) \sigma_{33} \quad \langle 2 \rangle$$

In einer unorientierten Probe, in der alle Orientierungen, allerdings mit verschiedener Wahrscheinlichkeit, vorhanden sind, erhält man ein charakteristisches Pulverspektrum, an dem man die Tensorelemente  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$  und  $\sigma_{33}$  ablesen kann. Abb. 12A zeigt ein Pulverspektrum für  $^{15}\text{N}$ , welches einen allgemeinen CSA-Tensor besitzt. In einigen Fällen, z. B. bei unorientierten Phospholipidvesikeln, wird eine Raumrichtung durch eine schnelle Bewegung der Lipidmoleküle um die eigene Achse ausgemittelt. Es resultiert ein axialsymmetrischer Tensor mit zwei identischen Hauptwerten, wie er in Abb. 12B gezeigt ist. Neben der hier verwendeten Konvention zur Charakterisierung eines CSA-Tensors gibt es noch einige andere, z. B. die Herzfeld-Berger Konvention [85] und die Haeberlen Konvention [86]. (Eine Übersicht findet man unter [87]).

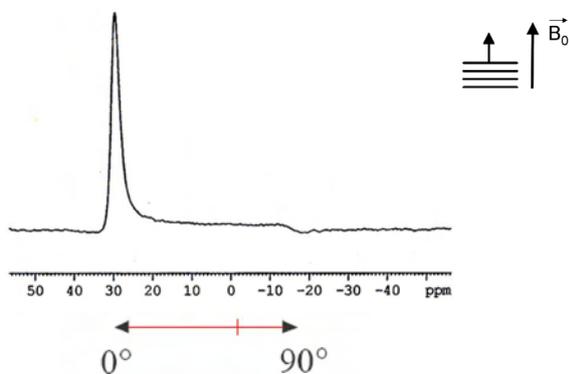


**Abb. 12:** Typische Linienformen von Pulverspektren. (A) Simuliertes ( $^1\text{H}$ -entkoppeltes)  $^{15}\text{N}$  Pulverspektrum ohne Bewegungs-Ausmittlung (nicht symmetrischer CSA-Tensor); (B) simuliertes  $^{31}\text{P}$  Pulverspektrum mit Bewegungs-Ausmittlung um  $\sigma_{33}$  (axialsymmetrischer CSA-Tensor mit zwei identischen Hauptachsenwerten,  $\sigma_{\perp} = (\sigma_{11} + \sigma_{22}) / 2$ ).

Eine schmale Linie am isotropen Mittelwert  $\sigma_{\text{iso}}$  wird erhalten, wenn sich die Probenmoleküle schnell und um alle Raumrichtungen bewegen (z. B. in Flüssigkeit) und die Elektronenhülle um den Kern dadurch zu einer sphärischen Verteilung gemittelt wird. Der isotrope Wert ergibt sich als Mittelwert der drei Hauptwerte:

$$\sigma_{\text{iso}} = \frac{1}{3}(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33}) \quad \langle 3 \rangle$$

Bei der Messung orientierter Proben vereinfacht sich das Pulverspektrum der überlappenden Linien und man erhält relativ scharfe Signale, da nur bestimmte Orientierungen vorhanden sind. Das Spektrum einer orientierten DMPC-Probe ist in Abb. 13 gezeigt. Da alle Lipidmoleküle parallel zu  $B_0$  orientiert sind, erhält man eine Linie bei der Position für  $0^\circ$  (ca. 30 ppm).



**Abb. 13:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum einer auf Glasplättchen orientierten Phospholipid-Probe (DMPC). Jedes einzelne Molekül ist in etwa parallel zu  $B_0$  orientiert. Die Breite der Linie und die charakteristische Linienform kommt durch kleine Abweichungen von dieser Orientierung zustande und wird als „mosaik spread“ bezeichnet.

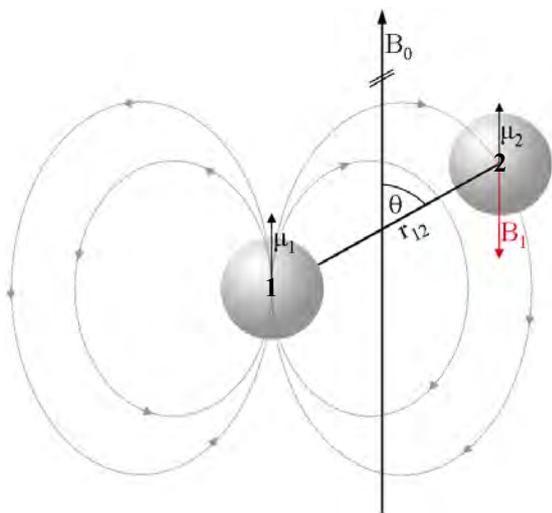
Um die chemische Verschiebung unabhängig von der Feldstärke des Spektrometers angeben zu können, wird sie relativ zu einer Referenzsubstanz (z. B. Tetramethylsilan für Protonen oder flüssiges Ammoniak für  $^{15}\text{N}$ ) angegeben. Sie ist dann durch die Formel

$$\sigma = \frac{\nu_0 - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \cdot 10^6 \quad < 4 >$$

definiert, mit  $\sigma$ : chemische Verschiebung,  $\nu_{ref}$ : Resonanzfrequenz der Standardsubstanz und  $\nu_0$ : Resonanzfrequenz des entsprechenden Kerns.

#### 1.3.3.1.4. Die dipolare Kopplung

Die Dipol-Dipol-Kopplung bezeichnet die Wechselwirkung zwischen den magnetischen Dipolmomenten zweier Kernspins über den Raum. Das magnetische Dipolmoment eines Kerns beeinflusst das Magnetfeld am Ort eines zweiten Kerns, der sich in direkter Nachbarschaft befindet (siehe Abb. 14). Diese Kopplung ist bei Kernen mit einem Spin von  $\frac{1}{2}$  häufig die dominierende Wechselwirkung im Festkörper, die hauptsächlich für die breiten Linien verantwortlich ist.



**Abb. 14:** Dipol-Dipol-Kopplung zwischen zwei Kernen 1 und 2. Die dipolare Kopplungskonstante ist abhängig vom Abstand  $r_{12}$  zwischen den Kernen und vom Winkel  $\theta$ . Das von Kern 1 verursachte Magnetfeld  $B_1$  verändert das effektiv gespürte Magnetfeld am Kern 2.

Die Stärke dieser Wechselwirkung hängt nicht nur vom Abstand der Kerne, sondern auch vom Winkel  $\theta$  der Verbindungsachse der Kerne mit dem äußeren Magnetfeld ab.

$$\nu_D = \nu_{D0} \cdot \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad < 5 >$$

Hierbei ist  $\nu_D$  die Kopplungsstärke und  $\nu_{D0}$  die Kopplungskonstante. Gleichung <5> wird Null für den Fall, dass die zwei koppelnden Kerne im so genannten „Magischen Winkel“  $\theta_M = 54,7^\circ$  zueinander stehen. Auch in Flüssigkeit wird die dipolare Kopplung durch isotrope Bewegungen zu Null gemittelt und ist daher dort nicht sichtbar.

Die Kopplungskonstante  $\nu_{D0}$  berechnet sich durch die Formel:

$$\nu_{D0} = \frac{\hbar\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1\gamma_2}{r_{1,2}^3} \quad < 6 >$$

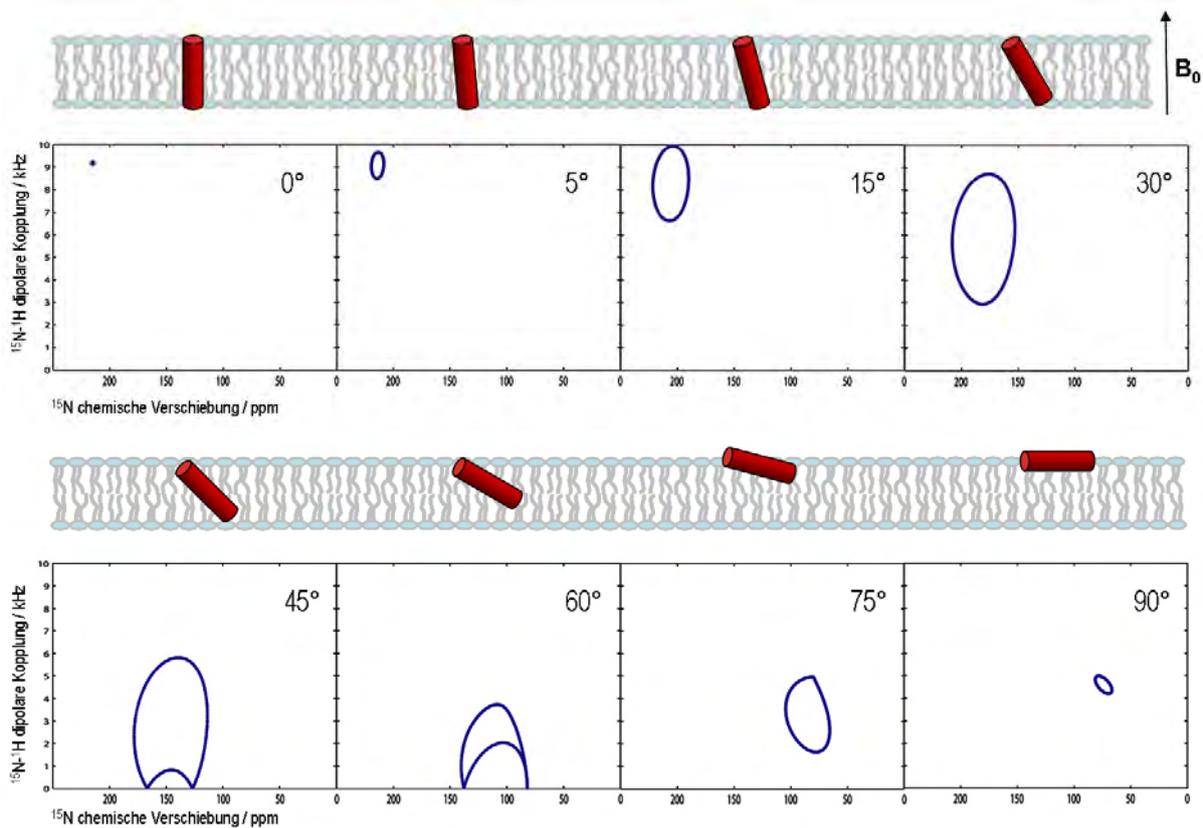
$\mu_0$  ist hier die Permeabilitätskonstante des Vakuums und  $r_{1,2}$  der Abstand zwischen den zwei Kernen. Man erkennt an der Proportionalität zu  $r^3$  die geringe Reichweite dieser Wechselwirkung.

### 1.3.3.2. Zweidimensionale Korrelationsexperimente – PISEMA und SAMMY

In einem PISEMA-Experiment [88] werden die  $^{15}\text{N}$  chemische Verschiebung und die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -dipolare Kopplung miteinander korreliert. Mit diesem Experiment kann die Sekundärstruktur und die Topologie von  $^{15}\text{N}$ -markierten Membranproteinen in orientierten Phospholipiddoppelschichten untersucht werden [89,90,91].  $\alpha$ -Helices zeigen in diesen zweidimensionalen NMR-Spektren charakteristische ringförmige Muster (*PISA-wheels*), deren spektrale Position und Ausdehnung (bei gegebener Helix-Geometrie) allein von der Orientierung der Helix in der uniaxial orientierten Membran abhängen.

In einem PISEMA-Spektrum werden Spin-Wechselwirkungen direkt aneinander gebundener Kerne, im Falle von Proteinen der Amidgruppe ( $^{15}\text{N}$ -H), gemessen. Da diese Systeme gut charakterisiert sind (die Bindungswinkel in  $\alpha$ -Helices, N-H-Bindungsabstände, Tensorelemente der chemischen Verschiebung sowie der dipolaren Kopplung bekannt sind), ist es möglich, die Spektren zu interpretieren und durch Vergleich mit simulierten Spektren zu quantifizieren.

In Abb. 15 sind die berechneten PISEMA-Spektren idealer  $\alpha$ -Helices mit Kippwinkeln von  $0^\circ$ - $90^\circ$  gezeigt.

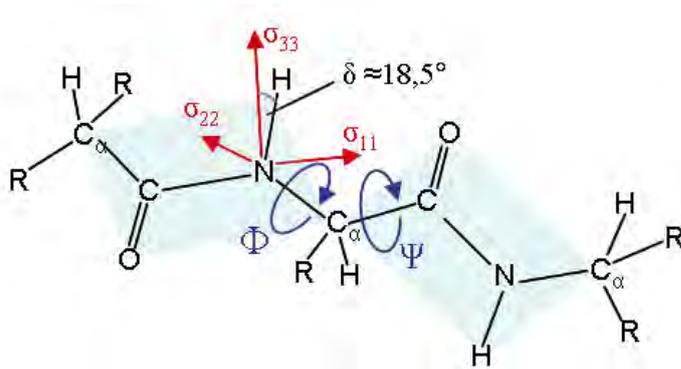


**Abb. 15:** Berechnete  $^{15}\text{N}$  chemische Verschiebung /  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dipolare Kopplung PISEMA-Spektren für ideale  $\alpha$ -Helices mit verschiedenen Kippwinkeln  $\tau$ . Über den simulierten NMR-Spektren sind jeweils die in Phospholipiddoppelschichten geneigten Helices symbolisch durch Zylinder dargestellt. Die Spektren der Helices zeigen charakteristische Ringmuster, deren Position und Form von der Neigung der Helix relativ zum Magnetfeld abhängt (weitere Erklärung siehe Text).

Wie kommen die *PISA-wheels* in einem PISEMA-Spektrum zustande?

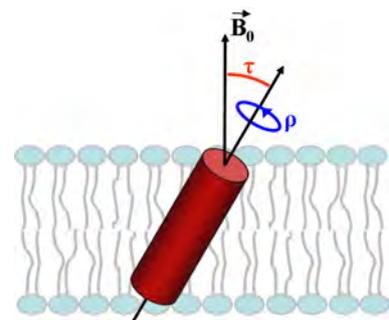
Die Resonanzen einer  $^{15}\text{N}$ -H-Gruppe, die in einer Peptidebene bestimmter Orientierung zum Magnetfeld liegt, sind gegeben durch die Lage der Tensoren der chemischen Verschiebung (CSA-Tensor) und der Dipol-Dipol-Kopplung (DD-Tensor) im Magnetfeld. Zwischen den Hauptachsen beider Tensoren liegt ein Winkel von etwa  $\delta = 18,5^\circ$ . Die Hauptachse des DD-Tensors fällt mit dem Bindungsvektor der  $^{15}\text{N}$ -H-Bindung zusammen (siehe Abb. 16). Betrachtet man eine  $\alpha$ -Helix, deren Achse parallel zum Magnetfeld ausgerichtet ist ( $\tau = 0^\circ$ ), so schließen alle N-H-Bindungen den gleichen Winkel mit dem Magnetfeldvektor  $B_0$  ein. Daher fallen alle Resonanzen in einem Punkt zusammen (siehe Abb. 15,  $0^\circ$ ). Ist die Helix leicht geneigt, wird diese Symmetrie gebrochen und es entsteht ein Ring, in dem jede Amid-N-H-Gruppe der Helix ihrer Orientierung entsprechend ein spezifisches Resonanzpaar (chemische Verschiebung, dipolare Kopplung) ergibt. Die Dipol-Dipol-Kopplung erreicht ihren Maximalwert für N-H-Vektoren, die parallel zu  $B_0$  ausgerichtet sind. Das ist bei leicht geneigten Helices (z. B.  $\tau = 15^\circ$ , siehe Abb. 15) gegeben, da die N-H-Bindungen einer idealen

Helix fast, jedoch nicht ganz parallel zur Helixachse liegen. Ist ein N-H-Bindungsvektor genau um den magischen Winkel ( $54,7^\circ$ ) geneigt, so besitzt diese Amidgruppe (aufgrund von Gleichung 5, siehe Abschn. 1.3.3.1.4.) eine dipolare Kopplung von 0 Hz. Kippwinkel, die größer als  $54,7^\circ$  sind zeigen negative Dipol-Dipol-Kopplungen. Da PISEMA-Spektren symmetrisch sind, wird in Abb. 15 nur die obere Hälfte der positiven Kopplungsfrequenzen gezeigt, wobei die negativen Frequenzen in das Spektrum „hereingespiegelt“ erscheinen.



**Abb. 16:** Die Diederwinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  (auch Torsionswinkel) beschreiben die Konformation einer Peptidkette. Während die Drehbarkeit der Peptidbindung wegen ihres teilweisen Doppelbindungscharakters stark eingeschränkt ist, sind Rotationen um die Einfachbindungen möglich.  $\Phi$  definiert die Drehung um die N-C $_{\alpha}$ -Bindung und  $\Psi$  die Drehung um die C $_{\alpha}$ -CO-Bindung. Zwischen der N-H-Bindung und der Hauptachse  $\sigma_{33}$  des CSA-Tensors liegt ein Winkel von etwa  $18,5^\circ$ . Die Hauptachse des DD-Tensors fällt mit dem N-H-Bindungsvektor zusammen.

Bevor die Strukturinformation eines NMR-Spektrums von einem uniform markierten Protein genutzt werden kann, müssen die NMR-Signale zugeordnet werden. Im Fall des PISEMA-Experiments kann jedoch bereits ohne die Zuordnung die Neigung einer Helix bestimmt werden, da die Form der PISA-*wheel*-Muster von der azimuthalen Drehung (Rotation  $\rho$ ) der Helix unabhängig ist. Weiterhin lässt sich die Länge der Helix anhand der Anzahl der Signale abschätzen, da jede N-H-Gruppe eines orientierten Proteins in einem PISEMA-Spektrum idealerweise genau ein scharfes aufgelöstes Resonanzsignal abgibt. PISA-*wheels* reflektieren die helikale Projektion einer Helix [92]. Bei Zuordnung mindestens eines Signals kann darüber hinaus die azimuthale Drehung (Polarität, siehe Abb. 17) der Helix in der Membran bestimmt werden [93].



**Abb. 17:** Die Winkel  $\tau$  und  $\rho$  charakterisieren die Orientierung einer Helix in einer Membran vollständig. Eine genauere Definition der Winkel ist in Abschn. 4.5.2.5. gegeben.

Ein weiterer Parameter, der erheblichen Einfluss auf die Resonanzen hat, ist die Dynamik des Systems. Für die Festkörper-NMR-Spektroskopie ist es im Gegensatz zur NMR in Flüssigkeit

wichtig, dass die Proteine durch ihre Membranumgebung auf einer Zeitskala der gemessenen Spin-Wechselwirkungen (im Millisekundenbereich) weitgehend immobilisiert sind, damit Ortsabhängigkeiten der chemischen Verschiebung und die Dipol-Dipol-Kopplung erhalten bleiben und nicht herausgemittelt werden. Andererseits führen Proteine Rotationsdiffusionsbewegungen ( $D_{\text{rot}} \geq 10^5$  Hz) um die Membrannormale aus, die dazu führt, dass selbst von Proteinen in den senkrecht orientierten Bizellen scharfe Linien erhalten werden. Dies wurde für Membranproteine mit bis zu sieben Helices gezeigt [94].

Bizellen führen zusätzlich ungerichtete schnelle „Wobbel“-Bewegungen [95] durch. Diese Bewegungen sind von Vorteil, da sie kleine Winkelverteilungen der einzelnen Moleküle (*mosaik spread*) ausmitteln und daher von diesen Proben schärfere Linien als von Glasplättchen-Proben erhalten werden.

Die Beweglichkeit eines Systems kann näherungsweise durch einen Ordnungsparameter  $S$  charakterisiert werden, der Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Ein Ordnungsparameter von  $S = 0$  entspricht einer schnellen, Ortsabhängigkeiten isotrop ausmittelnden Bewegung, wohingegen ein Wert von  $S = 1$  einem System entspricht, das außer einer eventuellen Rotationsdiffusion keine Bewegungsausmittlung erfährt. Helices in orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen sind durch sehr geringe Beweglichkeit gekennzeichnet, sodass ein Ordnungsparameter von  $S = 1$  angenommen werden kann [96]. Die Wobbel-Bewegung von Bizellenproben weist relativ dazu typischerweise einen Wert von ungefähr  $S = 0,8$  auf [97].

Bizellen orientieren sich mit ihrer Membrannormale senkrecht zum Magnetfeld, also um  $90^\circ$  gedreht verglichen zu einer Glasplättchenprobe. Daher erscheinen die PISEMA-Spektren von Proteinen in (nicht geflippten) Bizellen um die isotrope Position  $\sigma_{\text{iso}}$  ( $120$  ppm  $^{15}\text{N}$  chemische Verschiebung und  $0$  Hz dipolare Kopplung) gespiegelt und um den Faktor 2 gestaucht. Die Resonanzfrequenzen für Bizellen-Proben lassen sich aus denen einer Glasplättchenprobe ( $\nu_{\text{bilayer}}$ ), deren Membrannormale parallel zum Magnetfeld ausgerichtet ist mit folgender Formel umrechnen [97]:

$$\nu_{\text{bicelle}} = \left(1 + \frac{S}{2}\right) \sigma_{\text{iso}} - \frac{S}{2} \nu_{\text{bilayer}} \quad < 7 >$$

Das in dieser Arbeit verwendete SAMMY-Experiment [98] ist eine neuere Variante des PISEMAs. Es werden die gleichen Parameter gemessen und die gleichen Informationen erhalten, das SAMMY ist jedoch messtechnisch etwas einfacher handhabbar (siehe Abschn. 3.3.8.1.).

---

## 2. Aufgabenstellung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Aufklärung der Sekundärstruktur und Topologie des Membranproteins TatA<sub>d</sub> aus *B. subtilis*, welches die Hauptkomponente des Zwillings-Arginin- Proteintranslokationsapparats darstellt.

Die Tat-Translokase transportiert ihre Substrate in gefalteter Konformation. Hierzu wird vermutlich von TatA, der molekular am häufigsten vorkommenden Komponente, eine Kanalpore gebildet. Wie diese Pore strukturell aufgebaut ist und es dem System möglich ist, Substrate variabler Größe über die Cytoplasmamembran zu schleusen, ohne diese für Ionen und andere Moleküle permeabel zu machen, sind Fragen, zu deren Beantwortung die Strukturaufklärung der Komponente TatA ein erster Schritt darstellt.

Es sollte ein detailliertes Strukturmodell von TatA<sub>d</sub> aufgestellt werden, dass anschließend mit den Strukturvorhersagen und postulierten Translokationsmechanismen kritisch verglichen werden sollte.

Als erstes sollten sowohl das ganze Membranprotein als auch die für die Strukturuntersuchungen strategisch wichtigen TatA-Fragmente TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub> rekombinant in *E. coli* hergestellt werden. Die Klone der betreffenden Konstrukte und des gesamten Proteins lagen bereits vor, und es sollte ein Expressions- und Aufreinigungsprotokoll zur Gewinnung der Proteine im mg-Maßstab erarbeitet werden. Für die NMR-spektroskopischen Messungen sollten die Proteine <sup>15</sup>N-markiert werden. Ein Teil der Proteine sollte zudem selektiv mit verschiedenen einzelnen <sup>15</sup>N-Aminosäuren markiert hergestellt werden.

Für die Untersuchung des Membranproteins und seiner Konstrukte in einer Umgebung die ihrer natürlichen möglichst nahe kommt, sollten die Proteine in Phospholipiddoppelschichten und anderen membranimitierenden Umgebungen rekonstituiert werden.

Es sollten zur Bestimmung der Sekundärstrukturen der jeweiligen Proteinregionen Circular-Dichroismus (CD) Messungen in verschiedenen Umgebungen durchgeführt werden. Die Topologie, d. h. die Ausrichtung der Sekundärstrukturelemente in der Membranumgebung sollte mit Hilfe der orientierten CD-Spektroskopie untersucht werden.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag darin, das Protein TatA<sub>d</sub> und seine Konstrukte mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie in orientierten Phospholipiddoppelschichten bzw. Lipid-Bizellen zu vermessen.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1. Materialien

Eine Liste der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien findet sich im Anhang dieser Arbeit.

#### 3.1.1. Expressionsstämme

*E. coli* TG1 pREP4/pQE9-TatA<sub>d</sub> [99]

Dr. Jörg Müller, Universität Jena

*E. coli* BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA<sub>22-70</sub>

Dr. Christian Lange,

Universität Karlsruhe

*E. coli* BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA<sub>1-45</sub>

Torsten Walther, Universität Karlsruhe

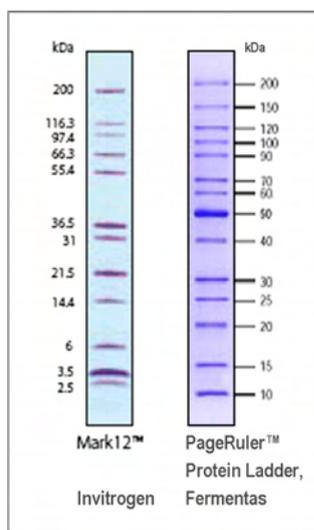
#### 3.1.2. Marker für SDS-PAGE

PageRuler™ Protein Ladder

Fermentas

Mark12™

Invitrogen



**Abb. 18:** Verwendete Marker für die SDS-PAGE.

## 3.2. Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

### 3.2.1. Medien für molekularbiologische Arbeiten

LB-Medium:	10 g Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt mit H <sub>2</sub> O bidest auf 1 l auffüllen pH = 7,5
LB-Agarplatten:	16 g Agar 1l LB-Medium Antibiotika, falls erforderlich Die betreffenden Antibiotika werden in gewünschter Menge erst kurz vor dem Gießen der Platten in das auf 50°C - 60°C abgekühlte Medium gegeben.
M9-Medium für uniforme <sup>15</sup> N-Markierung:	830 ml H <sub>2</sub> O bidest., autoklaviert 100 ml 10 x M9-Salz 5 ml <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl (1 g in 5 ml) 5 ml MgCl <sub>2</sub> (1 M) 240 µl Thiamin (0,2 M) 1 ml Antibiotikastammlösung (Resistenzen siehe Tabelle 5) 25 ml Glucose (20 %) 50 µl CaCl <sub>2</sub> (1M) 20 ml Vitaminmix 10 ml Spurenelementlösung

## M9-Medium für selektive

<sup>15</sup>N-Markierung:

100 ml 10 x M9-Salz + 800 ml H<sub>2</sub>O bidest.  
werden in einem 2 l-Erlmeyerkolben autoklaviert.

5 ml NH<sub>4</sub>Cl (unmarkiert, 1 g in 5 ml)

5 ml MgCl<sub>2</sub> (1 M)

240 µl Thiamin (0,2 M)

1 ml Kanamycin(50 mg/ml)

25 ml Glucose (20 %)

50 µl CaCl<sub>2</sub> (1M)

10 ml Vitaminmix II (Sigma)

100 ml Aminosäuremix (wird 30 min vor der  
Induktion hinzugefügt, siehe Abschn. 3.3.2.1.3.)

**3.2.2. Stammlösungen für molekularbiologische Arbeiten**

10 x M9-Salz-Lösung

4,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

6,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

500 mg NH<sub>4</sub>Cl

1,2 g Na SO<sub>4</sub>

in 50 ml H<sub>2</sub>O bidest. auflösen,

autoklavieren, Lagerung bei RT

Spurenelementlösung:

2 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

120 mg MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O

80 mg CoCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O

70 mg ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O

30 mg CuCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O

600 mg FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O

600 mg CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O

500 mg EDTA

in 100 ml H<sub>2</sub>O bidest. auflösen,

steril filtrieren, Lagerung bei -20°C

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 H<sub>2</sub>O bidest. auflösen,  
steril filtrieren, Lagerung bei -20°C

Aminosäuremix für selektive <sup>15</sup>N-Markierungen:

Für die selektive Markierung mit einer <sup>15</sup>N-Aminosäure, werden die betreffende markierte und alle restlichen unmarkierten Aminosäuren (Mengen siehe Tabelle 4) eingewogen, mit 100 ml H<sub>2</sub>O bidest. versetzt und autoklaviert. Die Aminosäuren lösen sich erst beim Autoklavieren. Vor der Zugabe in das M9-Medium muss die Lösung auf 37°C abkühlen.

**Tabelle 4:** Aminosäuremix für die selektive <sup>15</sup>N-Markierung.

Selektive <sup>15</sup> N-Markierung	100 mg/ l	200 mg/ l	300 mg/ l	500 mg/ l
<b>Ala</b>	<sup>15</sup> N-Ala, β-Ala (unmarkiert)	Arg, Lys, Cys, Met, His, Gln, Asn, Pro, Tyr, Trp, Ser, Gly, Thr,	Val, Leu, Ile	Glu , Asp
<b>Ile</b>	<sup>15</sup> N-Ile	Arg, Lys, Cys, Met, His, Gln, Asn, Pro, Tyr, Trp, Ser, Gly	Ala, Val, Leu, Thr,	Glu , Asp
<b>Leu</b>	<sup>15</sup> N-Leu	Arg, Lys, Cys, Met, His, Gln, Asn ,Pro Tyr, Trp, Ser, Gly, Thr	Ala, Val, Ile	Glu , Asp
<b>Phe</b>	<sup>15</sup> N-Phe	Arg, Lys, Cys, Met, Thr, His, Gln, Asn, Pro	Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Trp, Ser, Gly	Glu , Asp
<b>Val</b>	<sup>15</sup> N-Val	Arg, Lys, Cys, Met, His, Gln, Asn, Pro, Tyr, Trp, Ser, Gly, Thr,	Ala, Leu, Ile	Glu , Asp

---

Kanamycin-Lösung	25 bzw. 50 mg/ml, Lagerung bei -20°C
Ampicillin-Lösung	85 mg/ml, Lagerung bei -20°C
Glucose-Lösung (20 %)	200 mg/ml, Lagerung bei 4°C
MgCl <sub>2</sub> -Lösung (1M)	203 mg/ml MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, Lagerung bei 4°C
Thiamin-Lösung (0,2 M)	68 mg/ml, Lagerung bei -20°C
IPTG-Lösung (200 mM)	47,7mg/ml, Lagerung bei -20°C
Pefabloc-Lösung (20 mM)	4,8 mg/ml Pefabloc, Lagerung bei -20°C
Benzamidin-Lösung (478,8 mM)	75 mg/ml , Lagerung bei -20°C

Alle Stammlösungen für die Kulturmedien werden, falls nicht anders angegeben mit H<sub>2</sub>O bidest. hergestellt und anschließend sterilfiltriert.

### 3.2.3. Puffer für die Gelelektrophorese

Anodenpuffer: 121,1 g TRIS (TRIS BASE)  
5 l H<sub>2</sub>O dest.  
pH = 8,9

Kathodenpuffer: 12,1 g TRIS (TRIS BASE)  
17,9 g Tricin  
1 g SDS  
1 l H<sub>2</sub>O dest.

2x SDS-PAGE Probenpuffer: 2,5 ml TRIS-HCl (1,0 M, pH = 6,8)  
5 ml SDS (10 %)  
12,5 ml Glycerin  
0,5 ml β-Mercaptoethanol  
25 mg Bromphenolblau  
29,5 ml H<sub>2</sub>O dest.

Färbe-Lösung: 250 mg Coomassie G-250  
50 ml Essigsäure

---

	450 ml Ethanol mit H <sub>2</sub> O dest. auf 1 l auffüllen
Fixier-Lösung:	500 ml Ethanol 100 ml Essigsäure mit H <sub>2</sub> O dest. auf 1 l auffüllen
Entfärbe-Lösung:	250 ml Ethanol 50 ml Essigsäure mit H <sub>2</sub> O dest. auf 1 l auffüllen

### 3.2.4. Stammlösungen für die Gelelektrophorese

APS-Lösung	100 mg/ml Ammoniumpersulfat, Lagerung bei 4°C
TRIS-HCl (1,0 M):	157 mg/ml, pH = 6,8 mit HCl einstellen, Lagerung bei RT
SDS-Lösung (10 %):	100 mg/ml, Lagerung bei RT

Lösungen zur Herstellung von SDS-Gelen:

4x TRIS-Cl-Lösung:	6,0 g TRIS (TRIS BASE) 4 g SDS mit H <sub>2</sub> O dest. auf 500 ml auffüllen pH = 6,80
TRIS-Cl-Lösung:	182 g TRIS (TRIS BASE) 1,5 g SDS mit H <sub>2</sub> O dest. auf 500 ml auffüllen pH = 8,45

### 3.2.5. Puffer für die Proteinisolierung

Puffer für die Ni-Affinitätschromatographie:

Bindungspuffer I:	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M NaCl 10 mM Imidazol pH = 7,4
Bindungspuffer II:	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M NaCl 20 mM Imidazol pH = 7,4
Elutionspuffer:	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M NaCl 0,5 M Imidazol pH = 7,4
Regenerierungspuffer: (Stripping-buffer)	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M NaCl 50 mM EDTA pH = 7,4
Nickelsulfat-Beladungs-Lösung: (100 mM)	2,3 g NiSO <sub>4</sub> ·6 H <sub>2</sub> O mit H <sub>2</sub> O bidest. auf 100 ml auffüllen
Puffer für die Gelfiltration:	20 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 150 mM NaCl pH = 7,0

Alle Puffer werden direkt vor der Verwendung entgast und filtriert.

---

Lagerung der Säulen:

Ni-NTA-Säulen:	20% Ethanol
Gelfiltrationssäulen:	0,05% NaN <sub>3</sub>

### **3.2.6. Verwendete Software**

XWinNMR (Bruker)

TopSpin (Bruker)

NMRPipe/NMRDraw [100]

Sparky [101]

## **3.3. Methoden**

### **3.3.1. Mikrobiologische Arbeitstechniken**

#### **3.3.1.1. Steriltechnik**

Alle Arbeiten, die eine sterile Umgebung erfordern werden unter der Reinraumbank durchgeführt. Benötigte Lösungen, Medien und Verbrauchsmaterialien werden 20 min bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 1,5 bar im Autoklaven sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen werden durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert. Glasgeräte werden mit Aluminiumfolie verschlossen 4 h bei einer Temperatur von 200°C im Trockenofen entkeimt. Vor und nach dem Entnehmen von sterilen Lösungen werden die Öffnungen ihrer Behältnisse über dem Bunsenbrenner abgeflammt.

#### **3.3.1.2. Herstellung einer Übernachtskultur**

Ein Kulturmedium wird angeimpft, indem eine einzelne Bakterienkolonie mit einer sterilen Impföse abgenommen und in das Medium getaucht wird. Um eine Übernachtskultur herzustellen, wird LB-Medium, dem das betreffende Antibiotikum zugesetzt ist, angeimpft und über Nacht bei einer Temperatur von 37°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 250 rpm inkubiert.

### **3.3.1.3. Anfertigung einer Glycerinkultur**

Die längerfristige Aufbewahrung von Bakterienzellen erfolgt bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in Form einer Glycerinkultur. Hierzu werden die Zellen in einer Übernachtskultur angezogen und im Verhältnis 1:1 mit steriler 50% Glycerin-Lösung gemischt und eingefroren.

### **3.3.1.4. Ausstreichen einer Glycerinkultur auf Agarplatten**

Um einzelne Bakterienkolonien zu erhalten, wird ein Verdünnungsausstrich gemacht. Einige Mikroliter einer auf Eis aufgetauten Glycerinkultur werden mit Hilfe einer sterilen Impföse auf einer Agarplatte ausgestrichen. Durch weiteres Ausstreichen des ersten Ausstrichs mit einer frisch sterilisierten Impföse wird die Zelldichte auf der Agarplatte verdünnt. Die Platten werden über Nacht mit der Agarfläche nach oben bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert und können anschließend, mit Parafilm verschlossen, mehrere Tage bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

## **3.3.2. Proteinchemische Arbeitstechniken**

### **3.3.2.1. Überexpression des Membranproteins TatA<sub>d</sub> und der Konstrukte TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub> in *E. coli***

#### **3.3.2.1.1. Überexpression in LB-Medium**

Zur Herstellung der unmarkierten Proteine wird LB-Medium, dem das betreffende Antibiotikum (siehe Tabelle 5) und 0,02% Glucose zugesetzt sind, mit Zellen einer Übernachtskultur im Verhältnis 1:200 beimpft. Die Kultur wird bei  $37^{\circ}\text{C}$  und einer Schüttlergeschwindigkeit von 250 rpm angezogen und die Expression bei einer Optischen Dichte von  $\text{OD}_{600} = 0,6-0,8$  mit 0,5 mM IPTG induziert. Zur Überprüfung der Expression wird stündlich 1 ml der Zellkultur entnommen, zentrifugiert und das Pellet in mittels SDS-Gelelektrophorese auf seinen Proteingehalt überprüft.

Die Expressionssysteme für die verschiedenen TatA-Konstrukte, die Antibiotikaresistenzen und die optimale Expressionszeit, welche für jedes Proteinkonstrukt durch Testexpressionen individuell ermittelt wird, können aus Tabelle 5 entnommen werden.

**Tabelle 5:** Expressionssystem und Anzuchsbedingungen der verschiedenen TatA-Konstrukte.

Protein	<i>E. coli</i> Stamm	Plasmide	Antibiotikaresistenz [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Expressionsdauer
TatA <sub>d</sub>	TG1	pREP4, pQE9	25 Kan, 85 Amp	20 h
TatA <sub>22-70</sub>	BL21(DE3)	pET-28a(+)	50 Kan	4-5 h
TatA <sub>2-45</sub>	BL21(DE3)	pET-28a(+)	50 Kan	20 h

Zur Ernte werden die Zellen 20 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird das Bakterienpellet in Affinitätschromatographie-Bindungspuffer (20-25 ml pro Liter Kultur), der auch als Aufschlusspuffer dient, resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

#### 3.3.2.1.2. Uniforme <sup>15</sup>N-Markierung

Für die uniforme *in vivo*-Markierung der Proteine mit dem Stickstoffisotop <sup>15</sup>N wird die Expression in einem definierten Minimalmedium (M9-Medium) durchgeführt, dessen einzige Stickstoffquelle aus isotonenangereichertem <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl besteht. 500 ml des M9-Mediums werden in einem 2 l-Erlenmeyerkolben mit 2,5 ml einer LB-Übernachtskultur (1:200) beimpft. Alle weiteren Schritte erfolgen wie bei der Überexpression in LB-Medium (siehe oben).

#### 3.3.2.1.3. Selektive <sup>15</sup>N-Markierung

Selektive <sup>15</sup>N-Isotopenmarkierungen mit nur jeweils einer bestimmten <sup>15</sup>N-markierten Aminosäure werden wie für die uniforme <sup>15</sup>N-Markierung beschrieben durchgeführt (siehe oben), jedoch enthält das M9-Medium ausschließlich unmarkiertes Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle. 30 min vor der Induktion mit IPTG wird dem Kulturmedium ein frisch autoklavierter und auf 37°C abgekühlter Aminosäuremix zugegeben, der neben der betreffenden <sup>15</sup>N-markierten Aminosäure alle restlichen unmarkierten Aminosäuren enthält (Mengen siehe Abschn. 3.2.2., Tabelle 4). Für die Markierung mit <sup>15</sup>N-Alanin, das zu „scrambling“ (zur biosynthetischen Umwandlung der markierten Aminosäure in andere Aminosäuren) neigt, enthält der Aminosäuremix zusätzlich noch unmarkiertes  $\beta$ -Alanin. Dieses ist in der Lage, die Alanin-Valin-Transaminase, das Enzym, das in *E. coli* hauptsächlich für die biosynthetische Umwandlung von Alanin verantwortlich ist [102], zu inhibieren [103] und so das Streuen der Markierung über das ganze Protein zu unterdrücken.

Zur Vermeidung von *scrambling* wird die Expression außerdem nach 2 h angehalten und die Zellen geerntet.

### 3.3.2.2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Überprüfung der Proben auf Proteingehalt, Proteinmenge und Reinheit erfolgt durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Die Zusammensetzung eines 16 %igen Polyacrylamidgels kann der Tabelle 6 entnommen werden.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung eines 16 %igen Polyacrylamidgels.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid	4.81 ml	350 µl
Stammlösung 1 : (30,5 ml Tris-HCl-Puffer 13,7 ml Glycerin 5,8 ml H <sub>2</sub> O)	5 ml	-
Stammlösung 2 : (14,4 ml 4x Tris-HCl-Puffer 35,6 ml H <sub>2</sub> O)	-	2 ml
20 % APS	50 µl	15 µl
TEMED	5 µl	2 µl

Zur Herstellung eines Gels für die SDS-PAGE wird zuerst das Trenngel möglichst rasch nach der Zugabe von APS und TEMED zwischen 2 Glasplatten in eine dafür vorgesehene Apparatur gegossen und danach mit Wasser überschichtet um eine Störung der Polymerisation durch Luftsauerstoff zu vermeiden. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels nach ungefähr 30 min wird das Wasser wieder entfernt und das Sammelgel gegossen, in das ein Kamm als Platzhalter für die Probenaschen gesteckt wird.

Die Gelelektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld durch ein Gel, welches wie ein Sieb wirkt und die Teilchen entsprechend ihres Größe-zu-Ladungs-Verhältnisses zurückhält. Zur Probenvorbereitung für die denaturierende SDS-Elektrophorese werden die Proteinproben mit einem Überschuss an SDS (Natriumdodecylsulfat) 3-10 min bei 97°C erhitzt. Dieses anionische Detergenz lagert sich an die Proteine und überdeckt ihre Eigenladungen, so dass Mizellen mit konstanter negativer

---

Ladung pro Masseneinheit entstehen und die Wanderungstrecke der Proteine in einer bestimmten Zeit nur noch von ihrer molekularen Masse abhängt. Zur Ermittlung der Molekulargewichte der Proteine wird ein Standard, bestehend aus Proteinen definierter Größe, mitlaufen gelassen.

Die Elektrophorese wird in einer Minigel-Elektrophoreseapparatur durchgeführt, deren Kammern mit Anoden und Kathodenpuffer befüllt werden. Das Gel wird bei einer Anfangsspannung von 100 V bei konstanter Stromstärke (ca. 40 mA) ungefähr 75 min laufen gelassen, bis die Bromphenolblau-Bande des Probenpuffers den unteren Gelrand erreicht hat. Danach wird das Gel erst 10 min in Fixierlösung fixiert, dann ca. 30 min in Comassie-Färbelösung gefärbt und schließlich entfärbt, bis die Proteinbanden klar erkennbar sind.

Zur Beschleunigung der Färbung und Entfärbung kann das Gel in den betreffenden Lösungen kurz in einem Mikrowellenherd erwärmt werden. Zur Dokumentation wird das Gel schließlich fotografiert oder eingescannt und das Bild digital gespeichert.

### **3.3.2.3. Zellaufschluss**

#### **3.3.2.3.1. Zellaufschluss mittels French-Press**

Dem in Bindungspuffer resuspendierten Zellpellet werden die Proteaseinhibitoren Benzamidin (0,2 mM) und Pefabloc (0,04 mM) und die DNase Benzonase (5 µl pro 20 ml Zellsuspension) zugegeben. In der French-Press werden die Zellen einem Druck von 1500 psi (ca.100 bar) ausgesetzt. Bei der Entspannung der Suspension platzen die Zellen und werden somit aufgeschlossen. Dieser Vorgang wird 3-5 Mal wiederholt, wobei die Zellen zwischen den Durchgängen je 3 min auf Eis abgekühlt werden. Anschließend werden die Zelltrümmer 15 min bei 5000 rpm und einer Temperatur von 4°C abzentrifugiert. Zur Abtrennung der Zellmembran wird das Lysat anschließend 1 h bei 25000 rpm ultrazentrifugiert.

#### **3.3.2.3.2. Zellaufschluss mittels Ultraschall**

Die Zellsuspension wird mit Bindungspuffer auf ein Volumen von 25 ml aufgefüllt, in ein Ultraschall-Aufschlußgefäß gefüllt und mit den Proteaseinhibitoren Benzamidin (0,2 mM) und Pefabloc (0,04 mM) und der DNase Benzonase (5 µl) versetzt.

Alternativ kann zum Schutz des Proteins vor proteolytischer Zersetzung ein fertig kommerziell erhältlicher Protease Inhibitor Cocktail zugesetzt werden. Ein Spatel Lysozym kann zur Unterstützung der Zellyse zugegeben werden. Der Zellaufschluss erfolgt in einem

Eisbad mit einer Ultraschallspitze in 4 Intervallen zu je 4 min bei 60% Leistung und 2 min Pause zwischen den Intervallen, um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden.

Anschließend werden die Zelltrümmer 15 min bei 5000 rpm und die Zellmembran 1 h bei 25000 rpm bei einer Temperatur von 4°C durch Zentrifugation abgetrennt.

#### **3.3.2.4. Solubilisierung der Membran- und Zelltrümmer-Fraktion**

Das hydrophobe Proteinkonstrukt TatA<sub>2-45</sub>, das hauptsächlich als integrales Protein in der Zellmembran zu finden ist oder beim Ultraschallaufschluss ausfällt, wird aus der Membran- und Zelltrümmerfraktion mit Hilfe des Detergenz N-Lauroylsarkosin (NLS) solubilisiert. Hierzu werden die Fraktionen in His-Trap-Bindungspuffer, dem 2% NLS zugesetzt sind, resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Suspensionen zur optimalen Solubilisierung 30 min in einem schwachen Ultraschallbad beschallt. Rückstände werden bei 25000 rpm und einer Temperatur von 4°C rpm in der Ultrazentrifuge abgetrennt.

Das Protein befindet sich solubilisiert im Überstand und kann durch weitere Reinigungsschritte isoliert werden.

#### **3.3.2.5. Chromatographische Methoden zur Protein-Isolierung**

Zur Isolierung der hydrophoben Proteine TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub> wird allen Puffern das Detergenz N-Lauroylsarkosin (0,2%) zugesetzt, um eine Aggregation der Proteine zu verhindern und die Bindung der Proteine an die Affinitätssäule zu verbessern..

##### **3.3.2.5.1. Ni-Affinitätschromatographie**

Die Proteine TatA<sub>d</sub>, TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub> werden mit einem N-terminalen, 6 Histidinreste enthaltenden Polypeptid (His-Tag) exprimiert, welches die Isolierung mittels Ni-Affinitätschromatographie ermöglicht. Die Histidine des His-Tags werden von immobilisierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen komplexiert und das Protein so selektiv an eine Ni-NTA-Säule gebunden. Durch Waschen der Säule mit Elutionspuffer, der einen Überschuss an Imidazol enthält, werden die Histidinreste von den Ni<sup>2+</sup>-Ionen verdrängt und das Protein wird eluiert.

##### **Ni-Affinitätschromatographie mit Hilfe der Chromatographiestation Gradi Frac™:**

Die Reinigung der Proteine TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>22-70</sub> erfolgt mit Hilfe der Chromatographiestation Gradi Frac™ nach den Angaben des Herstellers. Es wird eine 5 ml HisTrap FF Säule verwendet, die im ersten Schritt mit 5-10 Säulenvolumen Bindungspuffer II äquilibriert wird.

---

Die partikelfrei filtrierte Proteinlösung (Zellysats bzw. Solubilisat) wird mit Hilfe einer Probenschleife (Superloop™) auf die Säule aufgetragen (Flussrate: 1 ml/min). Anschließend wird die Säule mit 5-10 Säulenvolumen des Bindungspuffers gewaschen. Bindungspuffer II enthält eine geringe Menge an Imidazol (20 mM), welches unspezifisch bindende histidinreiche Proteine von der Säule verdrängt. Nach dem Waschen der Säule wird das zu isolierende Protein mit 5-10 Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert. Die Flussrate beträgt 5 ml/min. Der Verlauf der Chromatographie kann über Leitfähigkeitsmessung und UV-Absorption bei 280 nm verfolgt werden. Der Säulendurchfluss wird mit einem Fraktionensammler gesammelt und die Fraktionen werden anschließend mittels SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt geprüft. Vor der Reinigung eines neuen Lysats wird die Säule mit EDTA-haltigem Regenerierungspuffer gereinigt und danach mit 100 mM NiSO<sub>4</sub>-Lösung frisch beladen.

#### **Manuelle Ni-Affinitätschromatographie:**

Zur Isolierung des Proteinkonstrukts TatA<sub>2-45</sub> wurden selbstgepackte Ni-NTA-Säulen verwendet. Diese werden nach dem Packen mit NTA-Harz und dem Beladen mit Nickel mittels Inkubation mit 100 mM NiSO<sub>4</sub>-Lösung über Nacht mit 4 Säulenvolumen Bindungspuffer I äquilibriert. Die das Protein enthaltende Lösung wird partikelfrei filtriert und auf die Säule aufgetragen, wobei ein langsamer Durchfluss gewählt wird (der Durchfluss erfolgt hier gravitationsgetrieben). Die Säule wird mit 5 Säulenvolumen Bindungspuffer I und 2 Säulenvolumen Bindungspuffer II gewaschen. Anschließend wird das Protein mit 4 Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert. Fraktionen werden gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt geprüft.

Die Regenerierung der Säule erfolgt wie oben beschrieben mit Regenerierungspuffer.

#### **3.3.2.5.2. Gelfiltration (Ausschlusschromatographie)**

Für die Proteine TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>22-70</sub> war eine Gelfiltration als weiterer Reinigungsschritt notwendig.

Bei der Gelfiltration erfolgt die Auftrennung nach dem hydrodynamischen Volumen der Probenmoleküle. Größere Moleküle durchlaufen die Säule schneller als kleinere, da sie nicht in die Poren der stationären Phase, eines porösen Trägermaterials mit definierter Porengröße, eindringen können.

**Aufreinigung von TatA<sub>d</sub> mittels Gelfiltration:**

Für die weitere Aufreinigung von TatA<sub>d</sub> wird eine HighLoad Superdex 200 pg (26/60) Säule mit einem Trennvermögen von 10-600 kDa und einem Säulenvolumen von 320 ml verwendet. Obwohl His<sub>6</sub>-TatA<sub>d</sub> eine molare Masse von lediglich 8,8 kDa besitzt, wird eine Säule mit optimalem Trennbereich in höheren Massenbereichen gewählt, da das Protein in NLS-Detergenzmizellen (ca. 4 nm) inkorporiert vorliegt. Die Probe, bestehend aus den vereinigten TatA<sub>d</sub>-haltigen Elutionsfraktionen der vorhergehenden Affinitätschromatographie, wird in einer Rührzelle (MWCO = 3,5 kDa) auf ein Volumen von 10 ml eingengt und sterilfiltriert. Vor dem Auftragen der Probe mittels einer Probenschleife (Superloop™) wird die auf NaN<sub>3</sub>-Lösung gelagerte Säule mit 3 Säulenvolumen (960 ml) Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Während des Durchlaufs werden 5-10 ml Fraktionen mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen. Die Trennung verläuft isokratisch bei einer Flussrate von 1,75 ml/min und die Elution von TatA<sub>d</sub> erfolgt unter diesen Bedingungen nach 40-50 min. Die betreffenden Fraktionen werden mittels SDS-PAGE auf Proteingehalt und Reinheit überprüft und TatA<sub>d</sub>-haltige Fraktionen werden vereinigt. Die Chromatographie wird mit Hilfe eines UV-Detektors bei 280 nm aufgezeichnet.

**Aufreinigung von TatA<sub>22-70</sub> mittels Gelfiltration:**

Für die Ausschlusschromatographie zur weiteren Reinigung des Proteinflragments TatA<sub>22-70</sub> wird eine HiPrep™Sephacryl™ S-100 HR (16/60) Säule mit einem optimalen Trennbereich von 1-100 kDa und einem Säulenvolumen von 120 ml verwendet.

Bevor die Proteinlösung aufgetragen werden kann, muss sie in einer Rührzelle (MWCO = 3,5 kDa) auf 5 ml pro Gelfiltrationsdurchlauf eingengt und sterilfiltriert werden. Die Säule wird mit 3 Säulenvolumen (360 ml) Gelfiltrationspuffer äquilibriert.

Die Flussrate beträgt 1,0 ml/min. TatA<sub>22-70</sub> eluiert hierbei nach einer Retentionszeit von 65-85 min. Die Detektion erfolgt über UV-Absorption bei 280 nm. Die betreffenden Fraktionen werden mittels SDS-PAGE auf Proteingehalt und Reinheit überprüft und die Fraktionen, welche das TatA<sub>22-70</sub> enthalten, werden vereinigt.

**3.3.2.6. Entfernung des Detergenz durch Dialyse**

Vor der Abspaltung des His-Tags mittels CNBr-Spaltung muss das Detergenz, das bei den Proteinen TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub> allen Puffern zur Proteinisolierung zugesetzt wurde, entfernt werden. Dies geschieht durch Dialyse gegen 5 l H<sub>2</sub>O bidest. Das Dialysewasser wird mehrmals am Tag gewechselt. Nach 2-3 Tagen wird das Protein aus dem Dialyseschlauch in

---

ein Falcon-Zentrifugationsgefäß umgefüllt und lyophilisiert. Für TatA<sub>d</sub> wurde ein Float-a-Lyzer™ aus regenerierter Zellulose mit einer Molekulargewichts-Ausschlussgröße (MWCO) von 3,5 kDa verwendet, für TatA<sub>2-45</sub> ein Einmal-Dialysierschlauch aus regenerierter Zellulose mit einer durchschnittlichen Porengröße entsprechend einer MWCO von 2,0 kDa.

### 3.3.2.7. Abspaltung des His-Tags mittels Bromcyan-Spaltung

Die Proteine wurden zur Erleichterung ihrer Isolierung rekombinant in Fusion mit einem N-terminalen His-Tag exprimiert. Zur strukturellen Charakterisierung der Proteine soll dieser His-Tag wieder entfernt werden. Hierzu bietet sich die Bromcyan-Spaltung an, welche das Protein selektiv nach Methionin spaltet. Bei TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub> (letzteres müsste streng genommen vor der CNBr-Spaltung TatA<sub>1-45</sub> genannt werden) stellt Methionin die erste Aminosäure dar und wird bei der Spaltung mit entfernt.

Ca. 20 mg Protein werden in 5 ml 70% Ameisensäure oder, alternativ, in 50% TFA gelöst mit 1-5 Mikrospateln CNBr versetzt. Diese Lösung wird im Abzug im Dunkeln (mit Alufolie bedeckt) 3-16 h gerührt. Anschließend wird die saure Lösung mit H<sub>2</sub>O bidest. auf ein Volumen von 20 ml verdünnt und gegen Wasser dialysiert bis das Dialysewasser einen neutralen pH-Wert angenommen hat. Nach einer Stunde Dialyse wird der Dialyseschlauch gewechselt, um eine Beschädigung der Membranporen durch die stark sauren Bedingungen zu vermeiden. Das Dialysewasser wird in Abfallkanistern gesammelt.

Alternativ kann die CNBr-Spaltungslösung nach dem Verdünnen mit Wasser eingefroren und lyophilisiert werden. Da das Reaktionsprodukt Methylthiocyanat und die verwendeten Säuren flüchtig sind, werden sie durch die Lyophilisation entfernt. Restliches CNBr muss nachträglich durch Entsalzung über Entsalzungssäulen oder durch Dialyse beseitigt werden.

### 3.3.2.8. Entsalzung über PD10 Entsalzungssäulen

Mit PD10 Entsalzungssäulen können Komponenten mit molekularen Massen kleiner als 5 kDa aus einem Gemisch abgetrennt werden. Als Elutionspuffer können sowohl Wasser, Puffer als auch Detergenz-Lösungen verwendet werden. Bei TatA<sub>22-70</sub> wurden die Säulen für die Entsalzung nach der CNBr-Spaltung mit H<sub>2</sub>O bidest. als Eluent verwendet, bei TatA<sub>d</sub> erfolgte damit eine Entsalzung in Anwesenheit von 0,2% NLS.

Die PD10 Säulen werden zuerst mit 25 ml Elutionspuffer equilibriert, dann werden 2,5 ml der Proteinlösung aufgetragen und schließlich wird das Protein mit 3,5 ml Elutionspuffer eluiert.

### 3.3.2.9. Übersichtstabelle zur Aufreinigung der verschiedenen TatA-Konstrukte

Zur Übersicht fasst Tabelle 7 die verschiedenen Aufreinigungsschritte der verschiedenen Proteinkonstrukte zusammen. Der Aufreinigungsprozess wurden an mehreren Stellen mittels SDS-PAGE überprüft (nicht in der Tabelle aufgeführt).

**Tabelle 7:** Aufreinigungsschritte der verschiedenen Proteinkonstrukte.

<b>Protein</b>	<b>TatA<sub>d</sub></b>	<b>TatA<sub>22-70</sub></b>	<b>TatA<sub>2-45</sub></b>
<b>Lokalisierung des Proteins</b>	Aufreinigung aus der Cytoplasmafraktion	Aufreinigung aus der Cytoplasmafraktion	Solubilisierung aus der Membran- und Zelltrümmerfraktion
<b>1. Isolierungsschritt</b>	Ni-Affinitätschromatographie in Anwesenheit von NLS	Ni-Affinitätschromatographie	Ni-Affinitätschromatographie in Anwesenheit von NLS
<b>Aufkonzentrierung</b>	Einengen der vereinigten Fraktionen mit Hilfe einer Rührzelle	Lyophilisation	-
<b>2. Isolierungsschritt</b>	Gelfiltration in Anwesenheit von NLS	Gelfiltration	-
<b>Entfernung des Detergenz</b>	Dialyse	-	Dialyse
<b>Trocknung des Proteins</b>	Lyophilisation	Lyophilisation	Lyophilisation
<b>Abspaltung des His-Tags</b>	CNBr-Spaltung	CNBr-Spaltung	CNBr-Spaltung
<b>Entsalzung</b>	Entsalzen mittels PD10 Säulen in Anwesenheit von NLS	Entsalzen mittels PD10 Säulen	Dialyse
<b>Entfernung von ungeschnittenem Protein und freiem His-Tag</b>	Subtraktive Ni-Affinitätschromatographie	Subtraktive Ni-Affinitätschromatographie	Subtraktive Ni-Affinitätschromatographie in Anwesenheit von NLS
<b>Entsalzung</b>	Entsalzen mittels PD10 falls notwendig für Probenvorbereitung direkt vor Messung	Entsalzen mittels PD10 Säulen	Dialyse
<b>Lagerung</b>	in NLS-haltigem Bindungspuffer bei 4°C	Lyophilisiert als Pulver bei -20°C	Lyophilisiert als Pulver bei -20°C

### 3.3.3. Massenspektrometrie (MALDI-TOF)

Aufgereinigte Proteine wurden mit MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight*) massenspektrometrisch auf ihre Identität und Reinheit überprüft.

In der Massenspektrometrie wird die Flugzeit ionisierter Probenmoleküle im elektrostatischen Feld gemessen, wobei man das Masse/Ladungs- $(m/z)$ -Verhältnis der Moleküle erhält. MALDI stellt eine besonders schonende Ionisierungstechnik dar, die eine Fragmentierung der Proteinmoleküle vermeidet. Hierbei werden die Probenmoleküle in das Kristallgitter einer geeigneten Matrix durch Kokristallisation eingebaut. Die Matrixmoleküle nehmen die Energie des Lasers auf und geben sie an die Analytmoleküle weiter, wodurch diese desorbiert und ionisiert werden und daraufhin im Hochvakuum durch ein elektrostatisches Feld in Richtung des Analysators beschleunigt werden.

Für die massenspektrometrische Charakterisierung der Proteine TatA<sub>d</sub>, TatA<sub>2-45</sub> und TatA<sub>22-70</sub> wird als Matrix eine gesättigte Lösung 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), in manchen Fällen auch Sinapinsäure (SA), in Acetonitril/H<sub>2</sub>O (2:1) mit 0,1% TFA verwendet. Eine kleine Menge der Probe wird mit der Matrix im Verhältnis 1:1 gemischt und 1 µl des Gemischs auf die Probenplatte (*Target*) aufgetragen. Die Messungen wurden von Dr. Sergiy Afonin mit einem MALDI-TOF-Gerät von Bruker Daltonics durchgeführt.

### 3.3.4. Rekonstituierung der Proteine in eine Modellmembran

Zur strukturellen Charakterisierung der Proteine in ihrer quasi-nativen Umgebung wurden TatA<sub>d</sub> und die Konstrukte TatA<sub>2-45</sub> und TatA<sub>22-70</sub> in verschiedene Modellmembranen rekonstituiert. Genaue Mengenangaben können den jeweiligen Probenvorbereitungs-Abschnitten der verschiedenen Messmethoden entnommen werden.

#### 3.3.4.1. Rekonstituierung in Vesikel mit Hilfe von Detergenz und Bio-Beads

Eine Methode der Rekonstituierung von Membranproteinen in Lipidvesikel erfolgt durch Kosolubilisierung von Protein und Lipiden mit Hilfe des Detergenz N-Lauroylsarkosin (NLS). Das Detergenz wird anschließend durch Adsorption an Bio-Beads entfernt, wobei sich unilamellare Proteoliposomen (LUVs) bilden.

Die Lipide (DMPC:DMPG = 30:70) werden in 0,5% NLS-Lösung bzw. NLS-haltigem Puffer (10 mM Na-Phosphatpuffer pH=7,0) gelöst und in einem Eppendorfgefäß mit Protein gemischt, welches in der gleichen Detergenz-Lösung vorliegt. Nach 15 min Inkubation bei

33°C wird ein Mikrospatel vorgewaschener Bio-Beads™ (SM-2) hinzugegeben und mit einem Mini-Rührfisch 1 h bei 33°C gerührt.

Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt, anschließend werden die Bio-Beads mittels Filtration durch Glaswolle abgetrennt. Um ein kleineres Volumen (250 µl für die CD-Spektroskopie) zu erhalten, können die entstandenen Liposomen durch Ultrazentrifugation (47500 rpm, 1h) pelletiert und anschließend in dem gewünschten Volumen und Puffer resuspendiert werden.

Vor dem Gebrauch werden die Bio-Beads zweimal mit Methanol, dreimal mit H<sub>2</sub>O bidest. und im letzten Schritt mit dem verwendeten Puffer gewaschen.

#### **3.3.4.2. Verwendung vorgefertigter Vesikel (LUVs)**

Ist das Protein wasserlöslich (wie im Fall von TatA<sub>22-70</sub>), kann es direkt zu zuvor hergestellten Vesikeln, zugegeben werden. Für die CD-Spektroskopie eignen sich als Modellmembranen besonders gut LUVs (LUV: *large unilamellar vesicles*), da sie eine relativ wenig gekrümmte Oberfläche besitzen (im Vergleich zu SUVs, *small unilamellar vesicles*) und sich nicht wie multilamellare Vesikel (MLVs) in der Suspension absetzen.

Zur Herstellung der LUVs werden die Lipide zunächst abgewogen und in einem Eppendorfgesäß in 50 µl Chloroform gelöst. Das Chloroform wird in einem Stickstoffstrom abgedampft bis nur noch ein Lipidfilm zurückbleibt und restliches Lösungsmittel wird über Nacht unter Vakuum im Exsikkator entfernt. Zu dem Lipidfilm wird 1 ml Natriumphosphatpuffer (10 mM, pH=7,0) hinzu gegeben. Die Probe wird 1 min lang gevortext, 10 min bei 35°C (über dem Phasenübergang der Lipide) inkubiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder bei 50°C im Wasserbad aufgetaut. Diese Schritte werden noch drei Mal wiederholt. Man erhält multilamellare Vesikel (MLVs).

Um unilamellare Vesikel definierter Größe zu erhalten, werden die MLVs extrudiert. Dazu wird zunächst der Metallblock des Extruders auf einer Heizplatte auf 50°C erwärmt. Der Extruder wird zusammengebaut, indem die gewünschten Filter eingespannt und eine der zwei Spritzen mit der MLV-Suspension befüllt wird. Nun wird die Probe von einer Spritze in die andere durch einen Filter gedrückt, bis nach ca. 15 Membrandurchritten LUVs entstanden sind [104].

#### **3.3.4.3. Rekonstituierung in Phospholipiddoppelschichten**

Für die OCD-Spektroskopie und die Festkörper-NMR-Spektroskopie an orientierten Lipiddoppelschichten werden die Proben an Trägeroberflächen aus Suprasil-Quarzglas bzw. Glas makroskopisch orientiert. Hierzu werden Proteoliposomen (Herstellung siehe oben) auf

Quarzglas- bzw. Glasplatten aufpipettiert. Beim Trocknen der Suspension verschmelzen die Vesikel zu Phospholipiddoppelschichten, die sich bei der Rehydratisierung in feuchter Atmosphäre mit samt den inkorporierten Proteinen an der Oberfläche des Trägers uniaxial ausrichten.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, das Protein mit den Lipiden in einem geeigneten organischen Lösungsmittel zu lösen (Kosolubilisierung) und es anschließend auf der Trägeroberfläche trocknen zu lassen. Lösungsmittelreste werden über Nacht im Hochvakuum vollständig entfernt.

Bei beiden Methoden werden die trockenen Lipidschichten in der OCD-Messzelle bzw. einer Hydratisierungskammer bei 97% Luftfeuchtigkeit (in Anwesenheit gesättigter  $K_2SO_4$ -Lösung) und 30°C (OCD) bzw. 40°C (Festkörper-NMR) mehrere Stunden hydratisiert.

#### **3.3.4.4. Rekonstituierung in Bizellen**

Für die Festkörper-NMR-Spektroskopie an  $TatA_{2-45}$  werden magnetisch ausrichtbare Bizellen mit einem Lipidanteil von 28% (w/v) (56 mg Lipidmasse insgesamt) in einem Verhältnis  $q=3,2$  von langkettigen zu kurzkettigen Lipiden verwendet.

Die Lipide, die in einer Chloroform-Stammlösung vorliegen, werden mit einer Hamiltonspritze in ein Reagenzglas gegeben und gemischt. Das Chloroform wird unter einem Stickstoffstrom im Abzug verdampft, so dass ein Lipidfilm übrig bleibt. Lösungsmittelreste werden über Nacht im Hochvakuum entfernt. Zu dem Lipidfilm werden 200  $\mu$ l  $H_2O$  bidest. gegeben und das Reagenzglas wird sorgfältig mit Parafilm verschlossen.

Liegen die Lipide als Pulver vor, kann eine wässrige Stammlösung des klebrigen, schwer abwiegbaren kurzkettigen Lipids (6-O-PC) hergestellt werden und anschließend die gewünschte Menge dieser Lösung direkt zu den pulverförmigen langkettigen Lipiden gegeben werden.

Die Lipidmischung wird abwechselnd auf Eis und bei 43°C inkubiert und zwischendurch gevortext, bis sich alle Lipide gelöst haben. Haben sich Bizellen gebildet, ist die Mischung bei tiefen Temperaturen (auf Eis) klar und dünnflüssig, während sie bei Temperaturen  $> 35^\circ C$  opak und viskos ist. Blasen werden durch Beschallen in einem Ultraschallbad oder Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen entfernt.

Die in kaltem Zustand klare und blasenfreie Lösung wird in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und ein pH-Wert von 6,6-6,8 wird in 1  $\mu$ l-Schritten auf Eis mit 0,1 M NaOH eingestellt.

160  $\mu$ l der Bizellenlösung wird zu ca. 3-5 mg Protein gegeben und 30 min bei 43°C inkubiert. Die Mischung wird gevortext, 10 min auf Eis gestellt, und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur äquilibrieren gelassen.

Hat sich alles Protein gelöst, wird die Probe 5 min auf Eis gestellt und anschließend mit einer im Kühlschrank vorgekühlten Pasteurpipette, in ein NMR-Probengefäß (5mm Flat BTM Cell) pipettiert und mit einem Gummistopfen verschlossen.

Der Gummistopfen wird mit einer Spritze durchstoßen, um einen Druckausgleich zu schaffen und überschüssige Luft wird entfernt. Die Probe wird mit Parafilm und Teflonband versiegelt und bis zur Messung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### 3.3.5. CD-Spektroskopie (Circulardichroismus)

Mit der Circulardichroismus(CD)-Spektroskopie kann die Sekundärstruktur von Proteinen qualitativ bestimmt werden. Ein Vorteil ist, dass nur wenig (ca. 0,05 bis 0,1 mg) Protein für die Messungen benötigt wird und die Probe nicht isopenmarkiert vorliegen muss. Die Methode beruht darauf, dass optisch aktive (chirale) Verbindungen links-zirkular und rechts-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Die Messgröße der CD-Spektroskopie, die Elliptizität ist proportional zu der Differenz der Absorption von rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht und wird im CD-Spektrum in Abhängigkeit von der Wellenlänge (im UV-Bereich, zwischen 180 und 260 nm) aufgezeichnet.

Proteinsekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt,  $\beta$ -Schleife und ungeordnete Knäuelstruktur zeigen in einem CD-Spektrum charakteristische Linienformen. Die Faltung eines Proteins, zumindest die Summe aller in einer Probe vorhandenen Strukturelemente, kann durch den Vergleich der experimentellen Daten mit geeigneten Protein-Referenzdatensätzen bestimmt werden. Bei Kenntnis der exakten Proteinkonzentration in der Lösung, können die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente mit Hilfe von mathematischen Algorithmen quantitativ ermittelt werden.

#### **Probenvorbereitung:**

Das Küvettenvolumen beträgt 250  $\mu$ l. Für jede Protein-Probe wird eine Referenzprobe ohne Protein auf die exakt gleiche Art und Weise hergestellt, gemessen und später von dem Proteinspektrum abgezogen.

**TatA<sub>22-70</sub>** wurde in verschiedenen membranimitierenden Umgebungen gemessen, nämlich in SDS- und DPC-Mizellen im molaren Verhältnis 1:150, in verschiedenen TFE-Konzentrationen und in DMPC- und gemischten DMPC/DMPG-Vesikeln unterschiedlicher Zusammensetzung. Das Protein-zu-Lipid-Verhältnis betrug P:L = 1:200. Überdies wurde das lösliche Proteinkonstrukt TatA<sub>22-70</sub> in reinem Natriumphosphatpuffer gemessen.

Zur Vorbereitung der Proben werden zweifach konzentrierte Stammlösungen hergestellt. 0,2 mg TatA<sub>22-70</sub> (38,9 nmol), 1,68 mg SDS (5,83  $\mu$ mol) und 1,84 mg DPC (5,83  $\mu$ mol) werden eingewogen und in 1 ml 10 mM NaP<sub>i</sub> pH = 7,0 gelöst. Außerdem werden Vesikel-Suspensionen (LUV) aus 5,27 mg DMPC (7,77  $\mu$ mol), 4,22 mg DMPC (6,22  $\mu$ mol) + 1,07 mg DMPG (1,55  $\mu$ mol) für gemischte Vesikel im Verhältnis DMPC:DMPG = 80:20 und 1,58 mg DMPC (2,33  $\mu$ mol) + 3,74 mg DMPG (5,43  $\mu$ mol) für gemischte Vesikel im Verhältnis DMPC:DMPG = 30:70 in jeweils 1 ml wie in Abschn.3.3.4.2. beschrieben hergestellt.

Jeweils 125  $\mu$ l der Proteinlösung wird mit 125  $\mu$ l der betreffenden anderen Stammlösung gemischt, so dass sich ein Probenvolumen von 250  $\mu$ l ergibt.

**TatA<sub>2-45</sub>:** 0,16 mg TatA<sub>2-45</sub> (34,3 nmol) werden mit 1,65 mg DMPG (2,4  $\mu$ mol) und 0,7 mg DMPC (1,03  $\mu$ mol) (DMPC:DMPG = 30:70, P:L = 1:100) in 50  $\mu$ l Chloroform/Methanol (v:v 1:1) in einem Eppendorffgefäß kosolubilisiert und das Lösungsmittel mit Hilfe eines Stickstoffstroms entfernt, so dass ein Lipidfilm übrig bleibt. Restliches Lösungsmittel wird über Nacht im Hochvakuum entfernt. Zu dem Lipidfilm werden 250  $\mu$ l Natriumphosphat-Puffer gegeben, und die Suspension wird eine Stunde lang in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend sonifiziert um SUVs (*small unilamellar vesicles*) zu erhalten.

**TatA<sub>d</sub>** wurde in SDS-Mizellen im molaren Verhältnis P:D = 1:150, in DMPC/DMPG (30:70) in einem Protein zu Lipid-Verhältnis von P:L = 1:100 und in 30% TFE gemessen.

TatA<sub>d</sub> liegt nach dem letzten Reinigungsschritt in Bindungspuffer mit 0,2% NLS vor und wird mittels PD10 Entsalzungssäulchen (siehe Abschn.3.3.2.8.) auf 0,5% NLS, 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH = 7,0 umgepuffert. Die Menge an Protein in der PD10-Elutionsfraktion wird mittels SDS-PAGE abgeschätzt. Nach der Umpufferung lag eine Lösung mit einer TatA<sub>d</sub>-Konzentration von ca. 0,5 mg/ml vor. Davon wurden 0,5 ml (ca. 0,25 mg TatA, 34 nmol) mit 0,5 ml einer Lipid- Mischung aus 1,65 mg DMPG (2,93  $\mu$ mol) und 0,7 mg DMPC (1,03  $\mu$ mol) in der gleichen Detergenzlösung gemischt. Aus dieser Mischung wird TatA<sub>d</sub> in DMPC/DMPG-Vesikel rekonstituiert wie in Abschn. 3.3.4.1. beschrieben. Die proteinhaltigen Vesikel werden abzentrifugiert und in 250  $\mu$ l 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH = 7,0 resuspendiert.

Für die Messung von TatA<sub>d</sub> in SDS-Mizellen und 30% TFE wird eine TatA<sub>d</sub>-Lösung dialysiert um das Detergenz NLS zu entfernen. Anschließend werden 125  $\mu$ l der Lösung mit zweifach konzentrierter SDS-Stammlösung im Verhältnis 1:1 gemischt, bzw. mit einer Mischung aus 75  $\mu$ l TFE und 50  $\mu$ l NaP<sub>i</sub> gemischt um ein Protein-zu-Detergenzverhältnis von 1:150 bzw. eine TFE-Konzentration von 30% zu erhalten.

---

**Messung der CD-Spektren:**

Die CD-Proben werden in Quarzglas­küvetten mit 1mm optischer Schichtdicke gefüllt und zwischen 260 und 190 nm in 0,1 nm-Schritten auf einem J-810 Spektropolarimeter gemessen. Für jede Probe werden drei Spektren mit einer Scan-Geschwindigkeit von 10 nm/min sequentiell erfasst und gemittelt. Die gleichfalls gemittelten Spektren der Referenzprobe ohne Protein wurden abgezogen. Die Messungen wurden, außer bei den Temperaturreihen, bei 30°C durchgeführt.

CD-Spektren von Proteinen werden üblicherweise in der Einheit der mittleren molaren Elliptizität dargestellt, d.h. die gemessene Elliptizität wird auf die mittlere molare Peptidkonzentration pro Aminosäurerest und die optische Schichtdicke normiert. Da die Proteinkonzentration aufgrund fehlender UV absorbierender aromatischer Aminosäurereste (Tryptophan oder Tyrosin) nicht exakt ermittelt werden konnte, wurden keine mittleren molaren Elliptizitäten (*mean residue ellipticities*) berechnet. Stattdessen wurden die gemessenen Elliptizitäten wie in den Legenden der Spektren jeweils beschrieben normiert.

Die Messungen der CD-Spektren wurden von Dr. Jochen Bürck im Forschungszentrum Karlsruhe durchgeführt.

**3.3.6. Orientierte CD (OCD)-Spektroskopie**

Die orientierte CD-Spektroskopie ist ein nützliches Werkzeug, um die Ausrichtung von  $\alpha$ -helikalen Membranproteinsegmenten in einer orientierten Modellmembran und damit die Topologie von Membranproteinen zu untersuchen. Da die Methode in der Einleitung beschrieben wird, soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden (siehe Abschn. 1.3.2.)

**Probenvorbereitung:**

Für die Messung von orientierten CD-Spektren werden die Proteine in Lipiddoppelschichten auf einer Quarzglasoberfläche orientiert. Hierzu werden 50-100  $\mu$ l einer Proteoliposomen-Suspension bzw. einer organischen Protein-Detergenz-Lösung auf eine UV-durchlässige Quarzglasplatte mit einem Durchmesser von 20 mm gegeben und trocknen gelassen. Das Quarzglasfenster mit der getrockneten Lipidschicht wird anschließend in einer Hydratisierungskammer ungefähr 15 h bei 30°C und einer Luftfeuchte von 97% hydratisiert. Für die OCD-Spektroskopie werden maximal 0,2 mg Lipid und 5-70  $\mu$ g Protein pro Probe verwendet.

Während für die CD-Proben Natriumphosphatpuffer verwendet wurde, werden alle Proben für die OCD-Spektroskopie mit H<sub>2</sub>O bidest. hergestellt, da ein zu hoher Salzgehalt die Orientierung der Lipide stört.

**TatA<sub>22-70</sub>:** 15 µg Tat<sub>22-70</sub> werden in insgesamt 30 µl, erst in 6 µl H<sub>2</sub>O bidest., dann in 24 µl TFE gelöst. Da eine solch kleine Menge an Protein schwierig abzuwiegen ist, wird vorher ein Aliquot aus einer Protein-Stammlösung entsprechend der gewünschten Menge lyophilisiert.

3 mg DMPC und 7 mg DMPG werden in 1 ml 80% TFE (erst in 800 µl TFE, dann in 200 µl H<sub>2</sub>O bidest.) gelöst. Zur Besseren Löslichkeit wird die Mischung 15 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Von dieser Stammlösung werden 20 µl zu der Proteinlösung pipettiert und die Mischung (50 µl) anschließend auf eine Quarzglasplatte gegeben und getrocknet. Restliches Lösungsmittel wird über Nacht im Vakuum entfernt.

**TatA<sub>2-45</sub>:** 15 µg TatA<sub>2-45</sub> werden mit 0,2 mg Lipiden (DMPC:DMPG = 30:70) in 50 µl Chloroform/Methanol (v:v 1:1) kosolubilisiert und auf eine Quarzglasplatte aufgetragen. Das Lösungsmittel wird über Nacht im Hochvakuum entfernt.

**TatA<sub>d</sub>:** 15 µg TatA<sub>d</sub>, welches nach Entsalzung mit PD10 Entsalzungssäulen (siehe Abschn.3.3.2.8.) in 0,5 %iger NLS-Lösung vorliegt, werden mit 40 µl Lipidstammlösung (3,5 mg DMPG und 1,5 mg DMPC in 1 ml 0,5 % NLS-Lösung) gemischt und mittels Bio-Beads™ in Vesikel inkorporiert wie in Abschn.3.3.4.1 beschrieben. Die Proteoliposomen (100 µl) werden anschließend auf eine Quarzglasplatte aufgebracht und trocknen gelassen.

#### **Messung:**

Die OCD-Probenzelle ist so konstruiert, dass der zirkular polarisierte Lichtstrahl senkrecht auf das Quarzglasfenster mit der Probe trifft. Ein kleines Volumen gesättigter K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung kann in den äußeren Teil der thermostatisierten Messkammer eingefüllt werden um eine Atmosphäre von 97% relativer Luftfeuchte aufrecht zu erhalten. Die OCD-Messzelle ist auf einer Rotationsbühne im Probenraum des Spektropolarimeters befestigt, wodurch OCD-Messungen bei 8 verschiedenen Rotationswinkeln (jeweils um 45° um den Messstrahl rotierte Probe) durchgeführt werden können, um spektrale Artefakte durch linearen Dichroismus der Probe ausmitteln zu können. Für jede Probe wird der Mittelwert aus 3 Spektren gebildet und der Lipidhintergrund einer Referenzprobe abgezogen. Es werden die gleichen Messparameter wie für die CD-Spektroskopie (siehe oben) verwendet.

Die Messungen der OCD-Spektren wurden von Dr. Jochen Bürck im Forschungszentrum durchgeführt.

### 3.3.7. Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie

#### 3.3.7.1. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC

Mit Hilfe des zweidimensionalen  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-NMR-Experiments ist es möglich, den Erfolg der  $^{15}\text{N}$ -Markierungen sowie die Qualität der Proteinproben zu überprüfen. In einem  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum ist die  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebung gegen die  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung aufgetragen. Für jede  $^{15}\text{N}$ -H-Bindung, also damit für jede Aminosäure (sofern keine  $^{15}\text{N}$ -H-Bindung in der Seitenkette der Aminosäure vorkommt und außer für Prolin, welches kein Amidproton besitzt) erhält man genau ein Signal. Durch Abzählen der Signale in einem HSQC-Spektrum kann man erkennen, ob jede in der Sequenz vorkommende Aminosäure markiert ist. Bei Aminosäuren-spezifischer Markierung kann damit geprüft werden, ob unerwünschtes „*scrambling*“ auftrat. Als *scrambling* bezeichnet man die biosynthetische Umwandlung einer Aminosäure in eine andere. Überdies kann anhand der spektralen Dispersion der Peaks und ihrer Linienform erkannt werden, ob ein Protein gefaltet ist und in nur einer Konformation vorliegt.

#### **Probenvorbereitung:**

2 mg lyophilisiertes pulverförmiges TatA<sub>2-45</sub> (uniform oder selektiv  $^{15}\text{N}$ -markiert) werden in detergentenhaltigem Puffer (90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O, 450 mM deuteriertes SDS<sub>d25</sub>, 10 mM NaP<sub>i</sub> pH = 6,0) gelöst. Für das H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O-Austauschexperiment wird die uniform markierte TatA<sub>2-45</sub>-Probe nach der Messung lyophilisiert und anschließend wieder in 90% D<sub>2</sub>O/10% H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **Messung:**

Alle HSQC-Experimente wurden an einem Bruker DMX 600 MHz Spektrometer bei einer Temperatur von 50°C durchgeführt. Nach dem „*shimmen*“ (Optimierung der Homogenität des Magnetfelds) wurden die 90°-Pulslängen der Protonen und des  $^{15}\text{N}$  bestimmt. Die Protonen-Einstrahlfrequenz wurde zur Wasserunterdrückung auf die Resonanz der Wasserlinie gesetzt.

Die Spektren der selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierten Proben resultieren aus Addition von 16-64 *Scans* und 96-128 Inkrementen in der indirekten  $t_2$ -Dimension. Für das Spektrum der uniform  $^{15}\text{N}$ -markierten TatA<sub>2-45</sub>-Probe wurden 400  $t_2$ -Inkmente mit je 12 *Scans* und für das Spektrum in D<sub>2</sub>O 256  $t_2$ -Inkmente mit je 12 *Scans* gemessen. Es wurde ein Zeitabstand zwischen den einzelnen *Scans* (*recycle delay*) von 1,3-1,5 s und eine Akquisitionszeit von 7,3 ms verwendet. Die Entkopplungsfeldstärken der  $^{15}\text{N}$ -Entkopplung während der Akquisitionszeit betragen 2,5 kHz.

Die Spektren wurden durch Multiplikation der FIDs mit einer Exponentialfunktion entsprechend einer Linienverbreiterung von 0,3 Hz und einer Auffüllung der FIDs auf 2048 Punkte (*zero filling*) in der direkten und 256 Punkten in der indirekten Dimension prozessiert. Die Visualisierung der Daten erfolgt mit NMRPipe/NMRDraw und Sparky.

### 3.3.8. Festkörper-NMR-Spektroskopie

#### 3.3.8.1. Aufnahmetechniken der Festkörper-NMR-Spektroskopie

##### Heteronukleare Entkopplung

Da die heteronukleare Dipol-Dipol-Kopplung in Festkörper-NMR-Spektren, insbesondere zwischen dem beobachteten Kern und den Protonen, sehr stark zur Linienverbreiterung beiträgt, wird meist während der Aufnahme des Signals (Akquisitionszeit) heteronuklear  $^1\text{H}$ -entkoppelt. Dies geschieht durch permanentes Einstrahlen auf der  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenz, wodurch ein alternierendes  $B_1$ -Feld senkrecht zu  $B_0$  entsteht (z. B. in x-Richtung des rotierenden Bezugssystems). Dadurch wird die  $^1\text{H}$ -Magnetisierung (im rotierenden Koordinatensystem) um die yz-Ebene gedreht. Der zu entkoppelnde Kern spürt nun eine oszillierende  $^1\text{H}$ -Magnetisierung, die sich bei genügend starker Entkopplungsleistung zu Null ausmittelt. Um die dipolaren Spin-Wechselwirkungen zu unterbinden muss die Entkopplungsfrequenz eine Stärke in der Größe der Dipol-Dipol-Wechselwirkung, im kHz-Bereich, besitzen, daher spricht man auch von Hochleistungsentkopplung.

##### Kreuzpolarisation

Die Kreuzpolarisation (*CP-cross polarization*) [105] ist eine der wichtigsten Methoden der Festkörper-NMR-Spektroskopie und kann sowohl die Signalintensität wenig empfindlicher Kerne (z.B.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) erhöhen, als auch die Zeitspanne zweier aufeinander folgender Pulssequenzen (*recycle delay*) verkürzen. Die Methode beruht darauf, dass Magnetisierung (Polarisation) von einem empfindlichen Kern (z. B.  $^1\text{H}$ ), mit großem gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma_{\text{H}}$ , auf einen unempfindlichen Kern (hier:  $^{15}\text{N}$ ), mit betragsmäßig kleinem gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma_{\text{N}}$ , übertragen wird.

Der wichtigste Baustein der CP-Pulssequenz ist die Mischzeit (auch Kontaktzeit), in der die Magnetisierung der empfindlichen, durch einen  $90^\circ_x$ -Puls angeregten Kerne ( $^1\text{H}$ ), und gleichzeitig die der unempfindlichen Kerne ( $^{15}\text{N}$ ), durch Einstrahlung eines starken  $B_1$ -Felds der jeweiligen Frequenz auf beiden Kanälen in -y-Richtung festgehalten wird (*spin-locking*).

In dieser Zeit wird die Magnetisierung übertragen. Damit die Kerne Magnetisierung austauschen können, müssen die eingestrahlten Radiofrequenzpulse die Hartmann-Hahn-Bedingung [106] erfüllen:

$$\gamma_{1H} \cdot B_{1,1H} = \gamma_{15N} \cdot B_{1,15N} \quad < 8 >$$

Unter dieser Voraussetzung sind die Kerne energetisch gekoppelt und können durch Spinflip-Prozesse energieerhaltend Magnetisierung austauschen. Während die Polarisation der empfindlichen  $^1\text{H}$ -Kerne wegen ihrer sehr viel größeren Häufigkeit in der Probe nur wenig abnimmt, steigt die der unempfindlichen Kerne stark an. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird ungefähr um den Faktor  $\gamma_{1H} / \gamma_{15N}$  verbessert. Außerdem kann die Pulswiederholungsrate erhöht werden, da die Signalstärke von der longitudinalen Relaxation der Protonen  $T_1(^1\text{H})$  abhängt, welche oft deutlich kürzer ist als die des unempfindlichen Kerns,  $T_1(^{15}\text{N})$ .

Abb. 19 zeigt eine einfache CP-Pulssequenz. Nach der Anregung des empfindlichen Kerns mit einem  $90^\circ$ -Puls und der CP-Mischzeit erfolgt die Akquisition des FIDs erfolgt unter Hochleistungsentkopplung. Oft wird die Amplitude, die Frequenz oder die Phase der eingestrahlten Radiofrequenz moduliert, um einen breiteren Bereich zu erzielen, in dem die Hartmann-Hahn-Bedingung erfüllt ist.

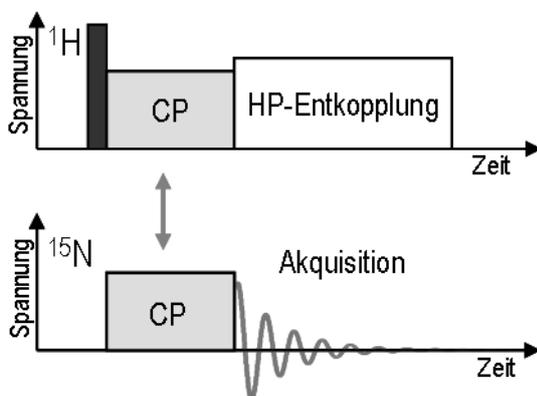


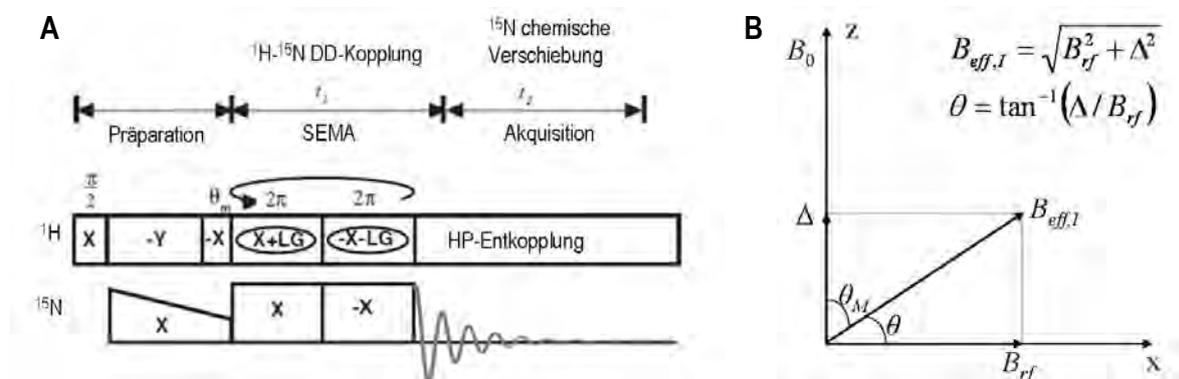
Abb. 19: Pulssequenz eines Kreuzpolarisationsexperiments.

### PISEMA und SAMMY

PISEMA und SAMMY sind zweidimensionale SLF (*separated-local-field*)-Festkörper-NMR-Experimente. Mit SLF-Pulssequenzen lassen sich die Spin-Wechselwirkungen der chemischen Verschiebung (hier  $^{15}\text{N}$ ) und der dipolaren Kopplung (hier  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) separieren und in zwei verschiedenen Frequenz-Dimensionen miteinander korrelieren [107].

In einem PISEMA (*polarization inversion spin exchange at the magic angle*) werden die Methoden der Kreuzpolarisation (CP), Polarisierungsumkehr (PI) und Magnetisierungsaustausch im magischen Winkel (SEMA) kombiniert [88].

Abb. 20A zeigt die Pulssequenz des PISEMAs. Nach der Kreuzpolarisation wird die transversale Magnetisierung der  $^1\text{H}$ -Spins durch einen  $35,3^\circ$ -Puls in den magischen Winkel geflippt und von der Lee-Goldburg Sequenz dort gehalten. In dieser SEMA-Periode ( $t_1$ ) entwickelt sich die heteronukleare  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -DD-Kopplung, während die homonukleare  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -DD-Wechselwirkung und die chemischen Verschiebungen unterdrückt werden. Die  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung entwickelt sich während  $t_2$  und wird während der Akquisition Protonen-entkoppelt.



**Abb. 20:** (A) Pulssequenz eines PISEMA-Experiments. Erklärungen siehe Text. (B) Effektives Feld im magischen Winkel während der Lee-Goldburg-Sequenz. Abbildung verändert übernommen von [102].

Multi-Pulssequenzen (*multiple pulse sequences*, MP) wie z. B. FFLG (flip-flop-Lee-Goldburg) [108] unterdrücken die linienverbreiternde homonukleare  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -dipolare Kopplung und die  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebung indem sie (im rotierenden Koordinatensystem) die  $^1\text{H}$ -Magnetisierung im magischen Winkel ( $54,7^\circ$ ) festhalten (*spin-locking*). In diesem Winkel werden die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen aufgrund ihrer Winkelabhängigkeit ( $\propto 3 \cos^2 \theta - 1$ ) Null. Die  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung wird unterdessen (während  $t_1$ ) durch einen  $^{15}\text{N}$ -Spinlock unterdrückt.

Die Phase des  $^1\text{H}$ -Spinlocks während der Kreuzpolarisation und des +LG (Lee-Goldburg) sollten hierbei um  $180^\circ$  verschoben sein, um eine Polarisierungsumkehr (PI) [109] zu erreichen, welche die Empfindlichkeit des Experiments um einen Faktor zwei verbessert [102].

Voraussetzung für die heteronukleare Dipol-Dipol-Kopplung während der SEMA-Periode ist die Einstellung der Hartmann-Hahn-Bedingung unter Berücksichtigung des magischen Winkels: die Radiofrequenzfeldstärke des Spinlocks auf die  $^{15}\text{N}$ -Spins muss der des effektiv gespürten Felds der Protonen entsprechen [110].

$$B_{rf,^{15}N} = B_{eff,^1H} = \left\{ B_{rf,^1H}^2 + \Delta^2 \right\}^{1/2} \quad < 9 >$$

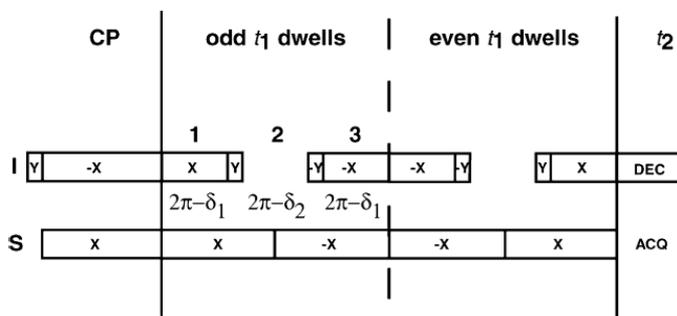
$\Delta$  ist hier der *offset* (die Verschiebung der Einstrahlfrequenz), der gebraucht wird, um die  $^1\text{H}$ -Magnetisierung während  $t_1$  in den magischen Winkel zu bringen [103] (siehe Abb. 20B).

Das PISEMA hat sich unter den SLF-Experimenten als besonders vorteilhaft erwiesen, da es eine effektive Linienverschmälerung bietet und die Größe der heterodipolaren  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Kopplung nur geringfügig herunterskaliert (Skalierungsfaktor = 0,82), ein unerwünschter Nebeneffekt der MP-Entkopplungssequenzen.

Eine ausführlichere Beschreibung des Experiments ist in der Literatur zu finden [88,107].

Die erst kürzlich entwickelten SAMMY-Experimente (SAMMY und SAMPI4) [98,111] stellen die gleichen Informationen wie das PISEMA zur Verfügung. Sie wurde konzipiert um eine höhere Toleranz gegenüber  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenz-Abhängigkeit zu erhalten. Es lässt sich dadurch ein breiterer Frequenzbereich optimieren. SAMMY-Experimente sind außerdem einfacher aufzusetzen und stellen weniger Ansprüche an den Probenkopf. Anstelle der Lee-Goldburg-Sequenz wird ein „*magic sandwich*“ [112] verwendet um unerwünschte  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Kopplungen zu refokussieren.

Die Pulssequenz des SAMPI4 ist in Abb. 21 zu sehen. Eine ausführliche theoretische Beschreibung der SAMMY-Experimente wurde von A. Nevzorov vorgestellt [98,111].



**Abb. 21:** Pulssequenz des SAMPI4-Experiments. Die Abbildung wurde übernommen von [111].

### 3.3.8.2. Probenvorbereitung

#### Herstellung unorientierter Pulverproben:

Zur Messung des lyophilisierten Proteinpulvers wurden 7 mg trockenes  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>22-70</sub> in einen 4 mm MAS-Rotor mit Insert gefüllt.

Für die Herstellung einer Proteinprobe in unorientierten Proteoliposomen wurde 1 mg TatA<sub>22-70</sub> wie weiter unten beschrieben mittels Kosolubilisierung mit POPC/POPG (30:70) in

einem Protein-zu-Lipid-Verhältnis von P:L = 1:100 in 80% TFE, 20% H<sub>2</sub>O bidest. rekonstituiert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurden 15 µl H<sub>2</sub>O bidest. zugegeben und die Suspension mit einem dünnen Glasstab gerührt. Die Probe wurde, durch wechselndes Inkubieren in flüssigem Stickstoff und einem Wasserbad bei 40°C, 5 Einfrier- und Auftau-Zyklen unterworfen und schließlich in einen 4 mm MAS-Rotor mit Insert gefüllt.

#### **Herstellung orientierter Proben:**

Zur Herstellung orientierter Proben werden prinzipiell zwei verschiedene Methoden verwendet: die Rekonstituierung des Proteins in mechanisch orientierte Phospholipiddoppelschichten auf Glasplättchen und die Rekonstituierung des Proteins in magnetisch orientierte Phospholipid-Bizellen.

#### **Orientierung von TatA<sub>22-70</sub> auf Glasplättchen:**

TatA<sub>22-70</sub> wird in einem Protein-zu-Lipid-Verhältnis von P:L = 1:100 in POPC/POPG (30:70) rekonstituiert. 1,625 mg <sup>15</sup>N-TatA<sub>22-70</sub> (0,31 µmol) werden hierzu in insgesamt 534 µl 80% TFE / 20% H<sub>2</sub>O bidest. (erst in 107 µl H<sub>2</sub>O bidest., dann in 427 µl TFE) gelöst und 3 min im Ultraschallbad sonifiziert. Die Lipide, 16,85 mg POPG (0,22 mmol) und 7,1 mg POPC (9,3 µmol), werden in insgesamt 960 µl 80% TFE / 20% H<sub>2</sub>O bidest., (erst in 768 µl TFE, dann in 192 µl H<sub>2</sub>O bidest.) bei 50°C im Wasserbad gelöst. Die Lösungen werden vermischt und in 62 µl-Aliquoten auf 24 Glasplättchen (18 mm x 7,5 mm x 60 µm) verteilt. Nach dem Trocknen und Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum werden die Glasplättchen gestapelt, wobei ein weiteres leeres Glasplättchen als Deckel dient. Der Stapel wird 48 h bei 40°C und 97% Luftfeuchte in Anwesenheit von gesättigter K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung hydratisiert. Zur Vermeidung von mikrobiellem Befall wird das beim Kosolubilisieren verwendete H<sub>2</sub>O bidest. mit 0,005% NaN<sub>3</sub> versetzt, welches nach dem Trocknen und der Rehydratisierung der Probe auf ca. 0,05% NaN<sub>3</sub> aufkonzentriert vorliegt.

#### **Orientierung von TatA<sub>2-45</sub> in Bizellen:**

Ca. 3 mg <sup>15</sup>N-TatA<sub>2-45</sub> bzw. <sup>15</sup>N-Val-TatA<sub>2-45</sub> werden wie in Abschn.3.3.4.4. beschrieben in anionische Bizellen (DMPC:DMPG = 80:20) rekonstituiert.

#### **3.3.8.3. <sup>31</sup>P-NMR-Experimente**

Mit Hilfe von <sup>31</sup>P-Festkörper-NMR-Spektroskopie können Bedingungen gefunden werden, unter denen sich die Proteine in Phospholipid-Doppelschichten orientieren. Es können unmarkierte Proteine zur Optimierung verwendet werden, da lediglich die Orientierung der Lipide geprüft wird. Sind die Lipide gut orientiert, so liegt das Protein in der Regel ebenfalls in seiner spezifischen Orientierung in den Lipiddoppelschichten vor.

Für TatA<sub>22-70</sub> wurden verschiedene Lipidkompositionen, verschiedene Rekonstituierungsmethoden, verschiedene Lösungsmittel für die Kosolubilisierung von Protein und Lipiden und verschiedene Protein-zu-Lipid-Verhältnisse probiert. Nur die für die späteren <sup>15</sup>N-NMR-Messungen verwendete Methode wurde in Abschn. 3.3.8.2. beschrieben.

**Messung:**

Die Messungen der <sup>31</sup>P-NMR-Spektren wurden an einem 500 MHz Spektrometer von Bruker (Avance II) mit einem tripelresonanten (<sup>1</sup>H/X/Y)-Probenkopf von Bruker (BioPE) mit einer horizontalen Flachspule mit rechtwinkligem Querschnitt (3 x 9 mm) bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt. Es wurde ein Hahn-Echo-Pulsprogramm mit einem Pulsabstand von 30 µs, einer Akquisitionszeit von 10 ms, einer Wiederholzeit (*recycle delay*) von 2s und einer <sup>1</sup>H-Entkopplungsfeldstärke von ca. 10 kHz verwendet. Die Spektren resultieren aus der Aufaddierung von 256 FIDs, welche zur Prozessierung auf 16384 Punkte aufgefüllt und mit einer Exponentialfunktion entsprechend einer Linienverbreiterung von 50 Hz multipliziert wurden. Die Visualisierung der Daten erfolgte mit XWinNMR und TopSpin.

**3.3.8.4. <sup>15</sup>N-NMR-Experimente****Messung:**

Alle <sup>15</sup>N-NMR-Messungen wurden gegen festes Ammoniumsulfat (26,8 ppm) referenziert, was einer Referenzierung von flüssigem Ammoniak auf 0 ppm entspricht. Es wurden Akquisitionszeiten von 8-10 ms verwendet und <sup>1</sup>H-Entkopplungsfeldstärken von 40-60 kHz. Zur Prozessierung der Spektren wurden die FIDs auf 1024-16384 Punkte verlängert (*zero filling*) und mit einer Exponentialfunktion entsprechend einer Linienverbreiterung 10-120 Hz multipliziert.

Das eindimensionale <sup>15</sup>N-NMR-Experiment an TatA<sub>22-70</sub> in orientierten Lipiddoppelschichten erfolgte an einem 600 MHz Spektrometer von Bruker (Avance II) mit einem doppelresonanten (<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N) Probenkopf von Bruker, der mit eigenentwickelter horizontaler Spezialspule („LowE“) zur Reduzierung der Probenaufheizung durch das eingestrahlte Radiofrequenzfeld ausgestattet war [113]. Der rechtwinklige Querschnitt der Spule betrug 3 x 9 mm. Es wurde ein Kreuzpolarisations-Pulsprogramm mit Frequenzmodulation und einer CP-Mischzeit von 800 µs verwendet.

Die Pulslängen und die Bedingungen für den Hartmann-Hahn-Match wurde aufgrund des geringen <sup>15</sup>N-NMR-Signals der Probe an der Modellsubstanz NH<sub>4</sub>Cl bestimmt. Es wurde eine Wiederholzeit zwischen den *Scans* von 2 s gewählt. Das Spektrum wurde bei T = 35°C mit 16384 *Scans* gemessen.

---

Die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Pulverspektren von  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>22-70</sub> wurden mit dem gleichen Spektrometer mit einem doppelresonanten ( $^1\text{H}/\text{X}$ )-Probenkopf von Bruker (BioPE) mit horizontaler Solenoid-Spule mit einem Innendurchmesser von 5 mm durchgeführt. Es wurde wie oben auf die Modellsubstanz  $\text{NH}_4\text{Cl}$  optimiert. Es wurde ein Pulsprogramm mit rampenförmiger Kreuzpolarisation mit einer Mischzeit von 1s verwendet. Die Temperatur betrug bei beiden Messungen  $35^\circ\text{C}$  und die Wiederholzeit 2s. Das Spektrum von lyophilisiertem TatA<sub>22-70</sub> resultierte aus 16384 *Scans*, während für das Spektrum von TatA<sub>22-70</sub> in unorientierten Liposomen 160000 *Scans* verwendet wurden. Die Visualisierung der Daten erfolgte mit XWinNMR und TopSpin.

Die Messungen an TatA<sub>2-45</sub> in Bizellen wurden an einem 500 MHz Bruker (Avance) Spektrometer mit einem 500/89 AS Magnex Magnet und einem doppelresonanten ( $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ )-Probenkopf mit horizontaler Solenoid-Rundspule mit einem Innendurchmesser von 5 mm durchgeführt.

Vor den Messungen wurden die Bizellen bei  $42^\circ\text{C}$  mindestens 30 min im Magnetfeld äquilibriert. Nach der Referenzierung und dem *Shimmen* auf die Wasserlinie (die Frequenzverschiebung durch das *Shimmen* der Probe wird registriert und bei der Referenzierung berücksichtigt) wurden die Einstrahlfrequenzen (*offsets*) in die Mitte der jeweils erwarteten Frequenzbereiche ( $^{15}\text{N}$  auf ca. 88 ppm und  $^1\text{H}$  auf ca. 9 ppm) gesetzt. Die Hartmann-Hahn-Bedingung konnte im Fall des uniform markierten TatA<sub>2-45</sub> direkt an der Probe bestimmt werden. Für die selektiv markierte Probe ( $^{15}\text{N}$ -Val-TatA<sub>2-45</sub>) konnten die Parameter anhand dieser Optimierung abgeschätzt werden. Zur Kompensation von nicht idealer Optimierung (*mismatch*) wird die Pulssequenz CP-MOIST [114] verwendet. Die heteronukleare  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Entkopplung wurde mit der Sequenz SPINAL-16 [115] durchgeführt. Die CP-Mischzeit betrug 1 ms und es wurde eine Wiederholzeit von 7 s zur Vermeidung einer Aufheizung der Probe zwischen den *Scans* gelassen. Für das eindimensionale  $^{15}\text{N}$ -Spektrum der uniform markierten TatA<sub>2-45</sub>-Probe wurden 9526 *Scans* aufgenommen, während das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -Val-TatA<sub>2-45</sub> aus 12246 *Scans* resultiert. Die Visualisierung der Daten erfolgt mit NMRPipe/NMRDraw und Sparky.

### 3.3.8.5. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ - PISEMA

Es wurde ein zweidimensionales  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Festkörper-NMR *polarisation inversion with spin exchange at the magic angle* (PISEMA)-Experiment an TatA<sub>22-70</sub> in POPC/POPG (30:70)-Phospholipiddoppelschichten auf Glasplättchen (Probenvorbereitung siehe Abschn. 3.3.8.2.) durchgeführt.

#### **Messung:**

Das PISEMA-Experiment [88] erfolgt an einem 600 MHz-Spektrometer (Bruker, Avance II) einem doppelresonanten ( $^1\text{H}/\text{X}$ )-Probenkopf von Bruker (BioPE) mit horizontaler rechtwinkliger Flachspule (Querschnitt: 3 x 9 mm).

Da das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Signal der Probe sehr schwach war, wurden die Pulslängen und die Bedingungen für den Hartmann-Hahn-Match an einer Modellsubstanz ( $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ) eingestellt.

Das PISEMA-Spektrum der uniform  $^{15}\text{N}$ -markierten TatA<sub>22-70</sub>-Probe wurde mit 3200 *Scans*, 256 komplexen Punkten in der  $t_2$ -Domäne und 128  $t_1$ -Inkrementen aufgenommen. Dabei wurde eine Wiederholzeit von 2 s verwendet. Die Visualisierung der Daten erfolgte mit XWinNMR und TopSpin.

### 3.3.8.6. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ - SAMMY

Es wurde ein SAMMY-Spektrum von uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>d</sub> und uniform und selektiv  $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>2-45</sub> in DMPC/DMPG (80:20)/6-O-PC-Phospholipid-Bizellen gemessen.

Zur Durchführung der SAMMY-Experimente wird die verbesserte Pulssequenz SAMPI4 [111] verwendet. Es werden Bizellen-Proben gemessen, die wie in Abschnitt 3.3.8.4. beschrieben äquilibriert und optimiert werden. Geräte werden ebenfalls wie in Abschnitt 3.3.8.4. beschrieben verwendet. Für die SAMPI4-Pulssequenz ist die genaue Länge des  $^1\text{H}$ -90°-Puls von Bedeutung. Sie wurde direkt an der Protein-Probe auf 0,1  $\mu\text{s}$  genau bestimmt und betrug für die uniform markierte Probe 4,65  $\mu\text{s}$ . Da die selektiv markierte  $^{15}\text{N}$ -Val-TatA<sub>2-45</sub>-Probe ein zu schwaches  $^{15}\text{N}$ -Signal abgab, um die Pulslängen und die Hartmann-Hahn-Bedingung an dieser Probe direkt zu bestimmen, wurden alle Parameter anhand der zuvor optimierten uniform markierten Probe abgeschätzt.

Das SAMMY-Spektrum des uniform  $^{15}\text{N}$ -markierten TatA<sub>2-45</sub> resultiert aus 320 *Scans*, 256 komplexen Punkten in der  $t_2$ -Domäne und 92 Inkrementen und das SAMMY von selektiv markiertem  $^{15}\text{N}$ -Val-TatA<sub>2-45</sub> aus 800 *Scans*, 256 komplexen Punkten in der  $t_2$ -Domäne und 48 Inkrementen. Die Visualisierung der Daten erfolgt mit NMRPipe/NMRDraw und Sparky.

### 3.3.9. Simulationen

Die experimentellen Daten wurden durch Simulationen von zweidimensionalen  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung/ $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -dipolare Kopplung NMR-Korrelationsspektren idealer  $\alpha$ -Helices mit verschiedenen Kippwinkeln gefittet.

Die Diederwinkel der idealen Helices wurden für jede Peptidbindung als gleich angenommen und betragen  $\Phi = -60,7^\circ$  und  $\Psi = -44,7^\circ$ . Für die Hauptwerte des  $^{15}\text{N}$ -CSA-Tensors wurden die Werte  $\sigma_{11} = 64$  ppm,  $\sigma_{22} = 77$  ppm und  $\sigma_{33} = 222$  ppm, für den Winkel zwischen dem Hauptwert  $\sigma_{33}$  und der N-H-Bindung wurden  $\delta = 18,5^\circ$  und für den N-H-Bindungsabstand  $1,07 \text{ \AA}$  verwendet. Es wurde ein Ordnungsparameter von  $S = 1$  für die amphiphile Helix (aus TatA<sub>22-70</sub>) in orientierten Phospholipiddoppelschichten und  $S = 0,83$  für die Transmembranhelix (aus TatA<sub>2-45</sub>) in Bizellen angenommen.

Die Simulationen zur Bestimmung der Kippwinkel der Helices wurden mit einem in der Gruppe von Prof. S. Opella (UCSD) geschriebenen Programm in Matlab [116] durchgeführt, während die Phase der Transmembranhelix von TatA<sub>2-45</sub> mit einem in der Gruppe von Prof. A. Ulrich geschriebenen Programm in C++ bestimmt wurde [117].

### 3.3.10. Abschätzung der Rotations-Korrelationszeit

Da sich Bizellen mit ihrer Normale senkrecht zum Magnetfeld ausrichten, bedeutet dies, dass obwohl die untersuchten Proteine eine einheitliche Orientierung bezüglich der Membrannormalen einnehmen, eine Vielzahl von Proteinorientierungen bezüglich der Magnetfeldrichtung auftritt. Axialsymmetrische Bewegungen wie die Rotationsdiffusion in der Membran, führen jedoch oft zu einer Ausmittelung der Wechselwirkungstensoren und damit zu ihrer einheitlichen Ausrichtung entlang der Membrannormale. Daher können auch in Bizellenproben scharfe Linien erhalten werden, sofern die Rotationsdiffusion schnell genug ist.

Die Rotations-Korrelationszeit  $\tau_{\text{rot}}$  der Rotationsdiffusion eines als zylinderförmig angenommenen Membranproteins kann wie folgt nach Saffman und Delbrück [118] abgeschätzt werden:

$$\tau_{\text{rot}} = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot h \cdot \eta}{k_B \cdot T} \quad < 10 >$$

Hierbei ist  $\eta$  die Viskosität der Membran,  $r$  der Radius und  $h$  die Höhe des Zylinders.

---

Um nun scharfe Linien in einem SAMMY-NMR-Spektrum zu erhalten, muss die Rotations-Korrelationszeit kurz sein verglichen mit der NMR-Zeitskala, gegeben etwa durch die größte Wechselwirkung in der Bizellen-Probe, die dipolare Kopplung:

$$\tau_{rot} \ll 1/2\pi \nu_D \quad < 11 >$$

$\nu_D$  ist hierbei die Größe der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Dipol-Dipol-Kopplung und beträgt etwa 10 kHz.

Nimmt man nun den TatA<sub>2-45</sub>-Proteinkomplex als zylinderförmig mit einem Radius von  $r = 50 \text{ \AA}$  und einer Höhe von  $h = 25 \text{ \AA}$ , eine Viskosität der Membran von  $\eta = 0,1 \text{ Pa} \cdot \text{s}$  und eine Temperatur von  $T = 315 \text{ K}$  an, so erhält man  $\tau_{rot} = 0,28 \cdot 1/2\pi \nu_D$

Obwohl die Genauigkeit der verwendeten Parameter (Viskosität der Bizellenmembran, Größe des Proteinkomplexes) beschränkt ist, sieht man, dass eine für eine Ausmittlung ausreichend schnelle Rotationsdiffusion selbst des Proteinkomplexes möglich ist.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Expression, *in vivo*-<sup>15</sup>N-Markierung und Aufreinigung von TatA<sub>d</sub> und seinen Konstrukten

#### 4.1.1. Expression der TatA-Proteine

Das Membranprotein TatA<sub>d</sub> und die Proteinkonstrukte TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub> wurden rekombinant in *E. coli* als Fusionspeptide mit einem N-terminalen His-Tag überexprimiert. Für die Expression wurden Plasmide verwendet, welche einen T7-Promotor enthalten und eine Induktion mit dem nicht metabolisierbaren Induktor IPTG erlauben.

Zur Optimierung der Proteinausbeute wurden Testexpressionen durchgeführt, mit denen die optimale Expressionsdauer und der Induktionszeitpunkt bestimmt werden konnten.

##### 4.1.1.1. Expression von TatA<sub>d</sub>

TatA<sub>d</sub> wurde sowohl unmarkiert in LB-Medium als auch uniform <sup>15</sup>N-markiert in M9-Minimalmedium hergestellt. Das M9-Medium enthält als einzige Stickstoffquelle isotopenangereichertes <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid. Abb. 22 zeigt die Wachstumskurven der *E. coli* Bakterien in LB- und M9-Medium bei einer Testexpression. Die Induktion der Expression mit IPTG ist jeweils mit einem Pfeil markiert. Das Zellwachstum in M9-Medium erreicht eine Optische Dichte von OD<sub>600</sub> von 3,0 und ist damit geringer als in LB-Medium, wo die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 3,9 aufweist.

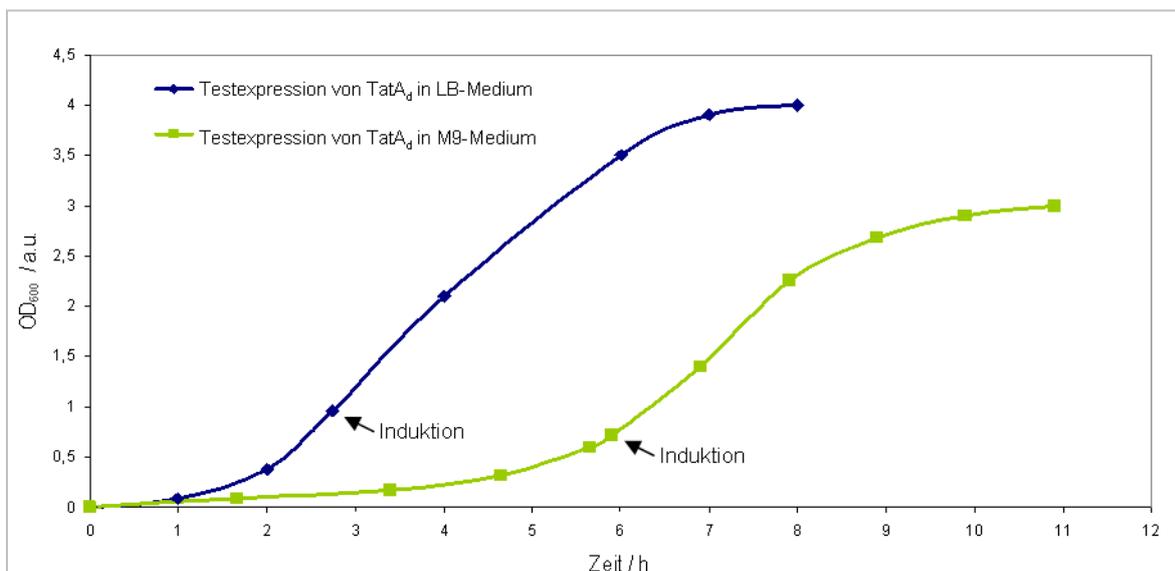
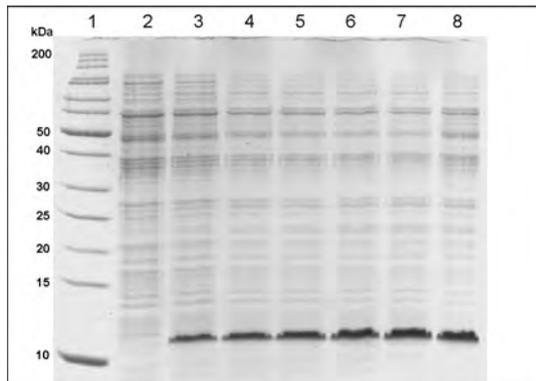


Abb. 22: Wachstumskurve der Testexpression von TatA<sub>d</sub> in LB- und in M9-Medium.

Zur Bestimmung der optimalen Expressionsdauer wurden der Kultur kurz vor der Induktion, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 17 h nach der Induktion jeweils 1 ml entnommen und wie in Abschn. 3.3.2.2. beschrieben für die SDS-Elektrophorese vorbereitet.

Abb. 23 zeigt das SDS-Gel der Testexpression in M9-Minimalmedium. Man kann sehen, dass selbst nach 17 h keine Degradation des Proteins durch das Bakterium erfolgt.



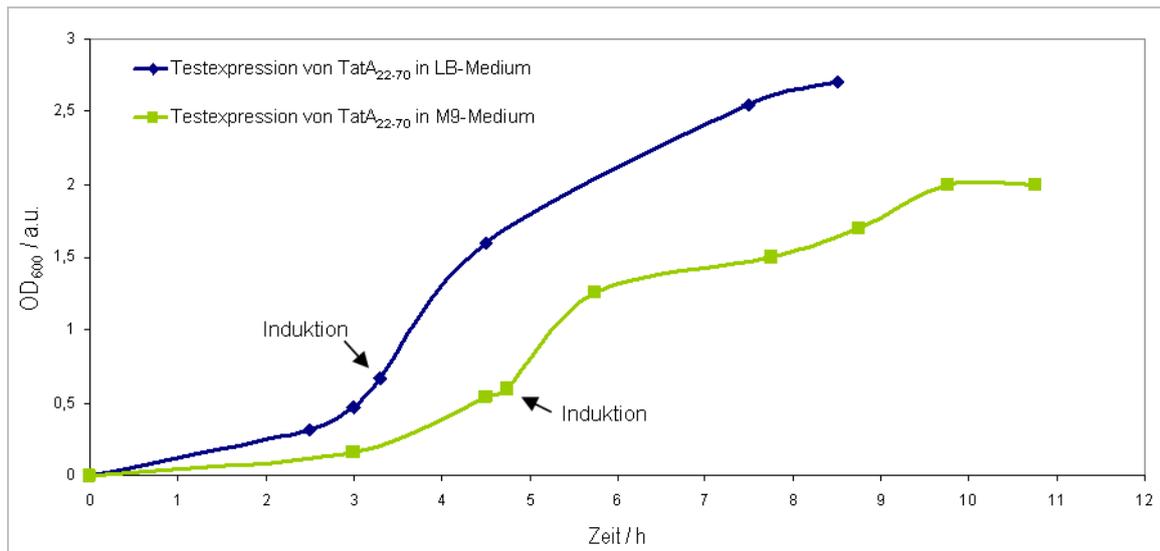
**Abb. 23:** SDS-PAGE einer Induktionsreihe von TatA<sub>d</sub>. Die Induktion erfolgte durch IPTG.

Spur 1: Marker (PageRuler™); Spur 2: kurz vor der Induktion; Spur 3: nach 1 h; Spur 4: nach 2 h; Spur 5: nach 3 h; Spur 6: nach 4 h; Spur 7: nach 5 h; Spur 8: nach 17 h.

Zur präparativen Herstellung des Proteins TatA<sub>d</sub> wurden 500 ml Kultur (*E. coli* TG1 pQE9TatA/pREP4) in einem 2 l Erlenmeyer-Kolben angezogen, bei einer OD<sub>600</sub> = 0,8 induziert und 16 h exprimiert. Die Proteinausbeute betrug ca. 25 mg/l Expressions-Medium aus LB- und ca. 20 mg/l aus M9-Medium. Die Proteinausbeute erwies sich als von dem Zeitpunkt der Induktion zwischen OD<sub>600</sub> = 0,6 und 1,0 unabhängig.

#### 4.1.1.2. Expression von TatA<sub>22-70</sub>

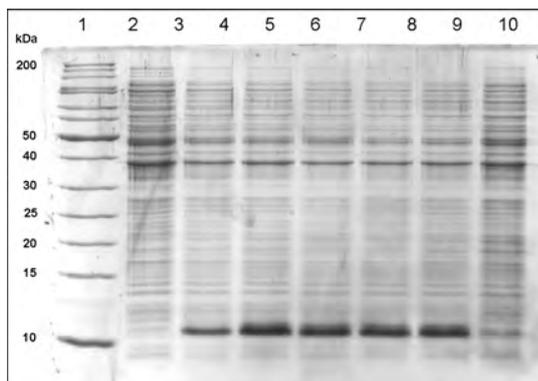
Das TatA-Konstrukt TatA<sub>22-70</sub> wurde ebenfalls unmarkiert in LB-Medium und uniform <sup>15</sup>N-markiert in <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl-M9-Minimalmedium überexprimiert. In Abb. 24 sind die Wachstumskurven der Bakterienkulturen bei Testexpressionen in beiden Kulturmedien verglichen. Auch hier ist das Wachstum der Bakterien in M9-Medium etwas geringer als in LB-Medium. Während in LB-Medium eine Optische Dichte von OD<sub>600</sub> = 2,7 erreicht wird beträgt sie in Minimalmedium 2,0 AU.



**Abb. 24:** Wachstumskurve der Testexpression von TatA<sub>22-70</sub> in LB- und in M9-Medium.

Zur Bestimmung der optimalen Expressionsdauer wurden der Kultur kurz vor der Induktion, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 17 h nach der Induktion jeweils 1 ml entnommen und wie in Abschn. 3.3.2.2. beschrieben für die SDS-Elektrophorese vorbereitet.

Abb. 25 zeigt das SDS-Gel einer Induktionsreihe (Testexpression) von TatA<sub>22-70</sub> in M9-Minimalmedium. Nach 20 h ist eine deutliche Abnahme des Proteins zu erkennen, die von der Degradierung des Proteins durch das Bakterium bei auftretendem Nährstoffmangel herrührt.



**Abb. 25:** SDS-PAGE eine Induktionsreihe von TatA<sub>22-70</sub>. Die Induktion erfolgte durch IPTG.

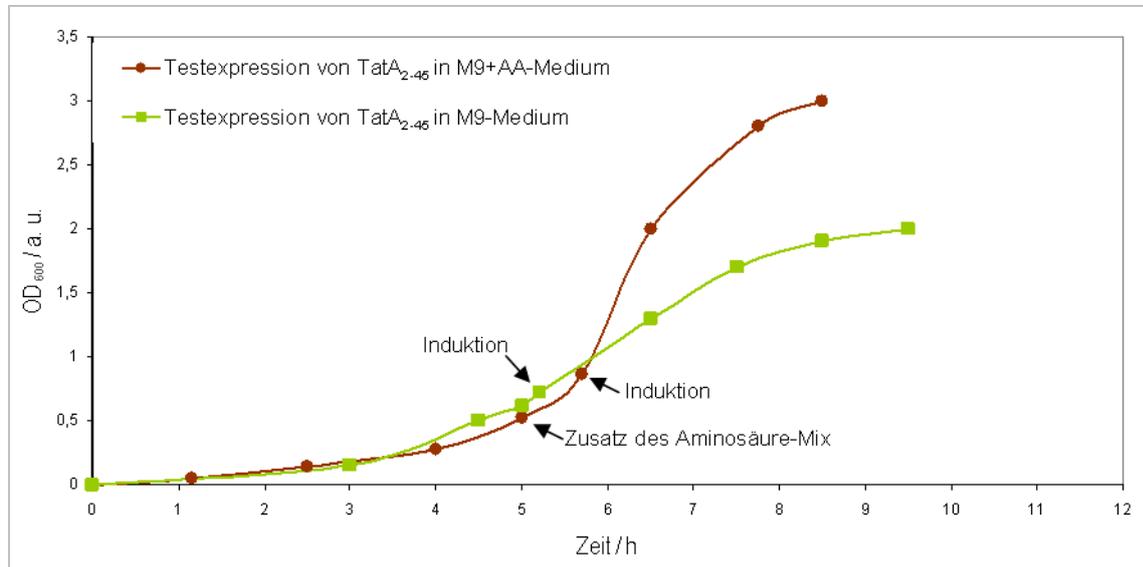
Spur 1: Marker (PageRuler™); Spur 2: kurz vor der Induktion; Spur 3: nach 1h;

Spur 4: nach 3 h; Spur 5: nach 4 h; Spur 6: nach 5 h; Spur 7: nach 6 h; Spur 8: nach 20 h.

Die präparative Herstellung von TatA<sub>22-70</sub> erfolgte aus 500 ml Kultur (*E. coli* BL21/DE3 pET28a) pro 2 l Erlenmeyer-Kolben mit einer Expressionsdauer von 5-6 h. Die Ausbeute an TatA<sub>22-70</sub> betrug ca. 20 mg/l aus LB- und 15 mg/l aus M9-Medium. Auch bei diesem Konstrukt war der Zeitpunkt der Induktion für die Proteinausbeute nicht ausschlaggebend.

#### 4.1.1.3. Expression von TatA<sub>2-45</sub>

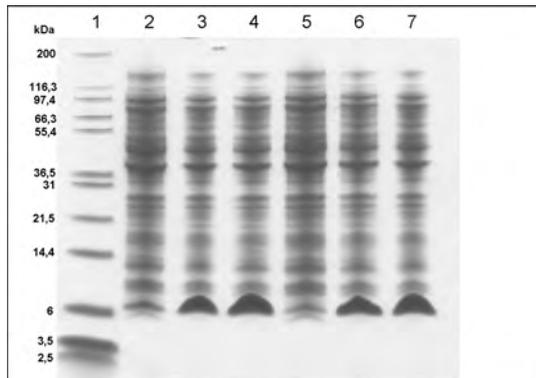
TatA<sub>2-45</sub> wurde uniform und selektiv <sup>15</sup>N-markiert hergestellt. Es wurde selektiv mit <sup>15</sup>N-Valin, <sup>15</sup>N-Alanin, <sup>15</sup>N-Leucin, <sup>15</sup>N-Isoleucin und <sup>15</sup>N-Phenylalanin markiert.



**Abb. 26:** Wachstumskurve der Testexpression von TatA<sub>2-45</sub> in M9-Medium mit und ohne Zusatz von Aminosäuren. Die Zugabe der Aminosäuren erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5, die Induktion mit IPTG erfolgte 40 min später bei einer OD<sub>600</sub> von 0,9.

Abb. 23 zeigt die Wachstumskurven der Zellen bei der Expression von TatA<sub>2-45</sub> in verschiedenen M9-Minimalmedien. Während das M9-Medium für die uniforme <sup>15</sup>N-Markierung <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl die einzige Stickstoffquelle enthält, wird in dem Minimalmedium für die selektive Markierung (M9+AA-Medium) unmarkiertes NH<sub>4</sub>Cl verwendet, dafür jedoch etwa ein Teilungszyklus vor der Induktion ein Gemisch aus der gewünschten markierten Aminosäure und allen anderen unmarkierten Aminosäuren zugegeben. Man erkennt deutlich den Anstieg des Zellwachstums nach der Zugabe des Aminosäuremix. Dies zeigt, dass die Zellen ihren Stoffwechsel umstellen und nur noch die vorgelegten Aminosäuren verwenden, anstatt Aminosäuren aus anorganischem Ammoniumchlorid zu synthetisieren. Die Zellkultur in reinem M9-Medium erreicht eine OD<sub>600</sub> von 2,0, wohingegen die Zellkultur in M9-Medium mit Zusatz der Aminosäuren bis zu einer OD<sub>600</sub> von 3,1 wächst. Obwohl die Testexpression zur Optimierung der Expressionsdauer ergab, dass TatA<sub>2-45</sub> über Nacht (20 h) exprimiert werden kann, wird für die präparative selektive Markierung nur 2 h lang exprimiert und anschließend geerntet. Die kürzere Expressionsdauer wird gewählt, um ein „scrambling“, eine biosynthetische Umwandlung der markierten Aminosäure in eine andere, und damit eine Verstreuung der Markierung, zu vermeiden.

Abb. 27 zeigt die Expression von  $^{15}\text{N}$ -Ala- und  $^{15}\text{N}$ -Phe-TatA<sub>2-45</sub>. Die SDS-Gele der anderen Markierungen sind identisch und werden deshalb hier nicht gezeigt.



**Abb. 27:** SDS-PAGE der Expression von selektiv  $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>2-45</sub>. Die Induktion erfolgte durch IPTG. Spur 1: Marker (Mark12™); Spur 2: kurz vor der Induktion; Spur 3: nach 1h; Spur 4: nach 2 h; Spur 5: kurz vor der Induktion; Spur 6: nach 1 h; Spur 7: nach 2 h; Spur 2-4:  $^{15}\text{N}$ -Ala-TatA<sub>2-45</sub>; Spur 5-7:  $^{15}\text{N}$ -Phe-TatA<sub>2-45</sub>.

Die Bildung von TatA<sub>2-45</sub> war, wie bei den anderen TatA-Konstrukten, von der Dichte der Zellkultur zum Zeitpunkt der Induktion unabhängig. Die Proteinausbeute betrug ca. 20 mg/l M9-Medium für die uniforme  $^{15}\text{N}$ -Markierung und 25 mg/l Kulturmedium in M9-Medium mit Zusatz des Aminosäuremix für die selektive  $^{15}\text{N}$ -Markierung. Der Erfolg der selektiven Markierung wurde durch HSQC-NMR-Spektroskopie (siehe Abschn. 4.4.1.) nachgewiesen.

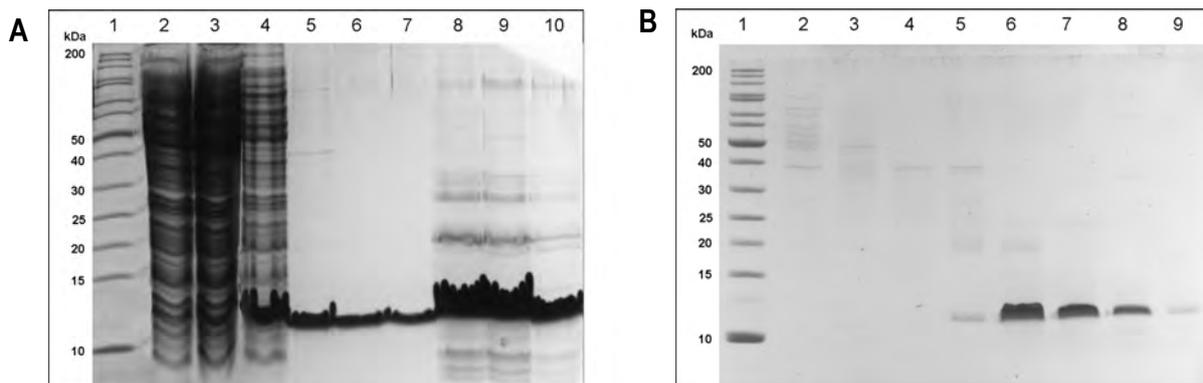
#### 4.1.2. Proteinisolierung und Reinigung

Die Proteine TatA<sub>d</sub>, TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub> wurden mittels Ni-Affinitätschromatographie isoliert, was durch einen N-terminal angeknüpften His-Tag, einem histidinreichen Polypeptid, möglich war. Der His-Tag wurde nach dem ersten Isolierungsschritt mittels CNBr-Spaltung abgespalten, und ungeschnittenes Protein sowie der frei vorliegende His-Tag wurden mit Hilfe einer subtraktiven Ni-Affinitätschromatographie entfernt. Im letzten Schritt wurden die Proteine, wenn nötig, einer Gelfiltration unterzogen.

Das anionische Detergenz N-Lauroylsarkosin (NLS) erwies sich als besonders nützlich, um die Proteine TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub> zu solubilisieren und in der Lösung zu stabilisieren. Weiterhin konnte durch Zugabe dieses Detergenz zu den Reinigungspuffern die Bindung der zur Homooligomerisierung neigenden Proteine an die Ni-NTA-Säule verbessert werden. NLS ist mit der Ni-Affinitätschromatographie kompatibel und kann, dank seiner hohen CMC (*critical micelle concentration*), durch Dialyse wieder entfernt werden.

#### 4.1.2.1. Aufreinigung von TatA<sub>d</sub>

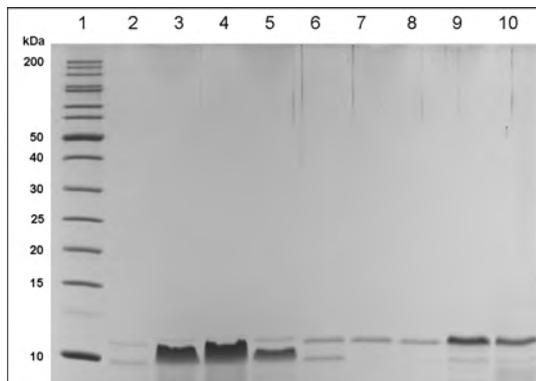
Das eigentlich integrale Protein TatA<sub>d</sub> wurde nach der Überexpression in *E. coli* hauptsächlich in löslicher Form im Zytosol gefunden und konnte direkt aus dem Zelllysat aufgereinigt werden. Zur Stabilisierung des Proteins in Lösung und zur Verbesserung der Bindung an die Ni-NTA-Säule, wurde dem Lysat und den Reinigungspuffern dennoch 0,5% NLS zugesetzt. Das SDS-Gel in Abb. 28A zeigt Fraktionen der Reinigung über eine Ni-Affinitätssäule (His-Trap 5ml FF). Die ersten vier Fraktionen enthalten viel Fremdprotein, wohingegen die Waschfraktionen (Spur 5-7) bereits sauberes His<sub>6</sub>-TatA<sub>d</sub> enthalten, welches nicht an die Säule gebunden hat. Trotz dem Hintereinanderschalten von zwei His-Trap-Säulen reichten die Ni-Bindungsplätze anscheinend nicht für die quantitative Immobilisierung des Proteins aus. Die Elutionsfraktionen hingegen (Spur 8-10) enthalten neben His<sub>6</sub>-TatA<sub>d</sub> noch andere Proteine als Verunreinigung und wurden daher nach Vereinigung und Aufkonzentrierung noch zusätzlich mittels Gelfiltration gereinigt (Siehe Abb. 28B).



**Abb. 28:** SDS-PAGE (A) Fraktionen der Ni-Affinitätschromatographie zur Isolierung von His<sub>6</sub>-TatA<sub>d</sub>. Spur 1: Marker (PageRuler™); Spur 2+3: Säulendurchfluß; Spur 4-7: Waschfraktionen mit Bindungspuffer; Spur 8-10: Elution mit Elutionspuffer. (B) Gelfiltration von His<sub>6</sub>-TatA<sub>d</sub>: Spur 1: Marker (PageRuler™); Spur 2: Fraktion 30-32,5 min; Spur 3: bis 35 min; Spur 4: bis 37,5 min; Spur 5: bis 40 min; Spur 6: bis 42,5 min; Spur 7: bis 45 min; Spur 8: bis 47,5 min; Spur 9: bis 50 min.

Nachdem die vereinigten TatA<sub>d</sub>-haltigen Gelfiltrationsfraktionen nochmals aufkonzentriert wurden, konnte mittels Dialyse gegen 5 l H<sub>2</sub>O bidest. (Float-a-Lyzer, MWCO = 3,5 kDa, 10 ml Volumen) über Nacht genügend NLS entfernt werden um eine CNBr-Spaltung zu ermöglichen. Die CNBr-Spaltungsreaktion erfolgte in 50% TFA mit einer Ausbeute von ca. 70%. Das Protein war nach der Abspaltung des His-Tags nicht mehr wasserlöslich, konnte jedoch in 2% NLS-haltigem Bindungspuffer resolubilisiert werden. Das SDS-Gel in Abb. 29 zeigt die Fraktionen der subtraktiven Ni-Affinitätschromatographie. TatA<sub>d</sub> ohne His-Tag

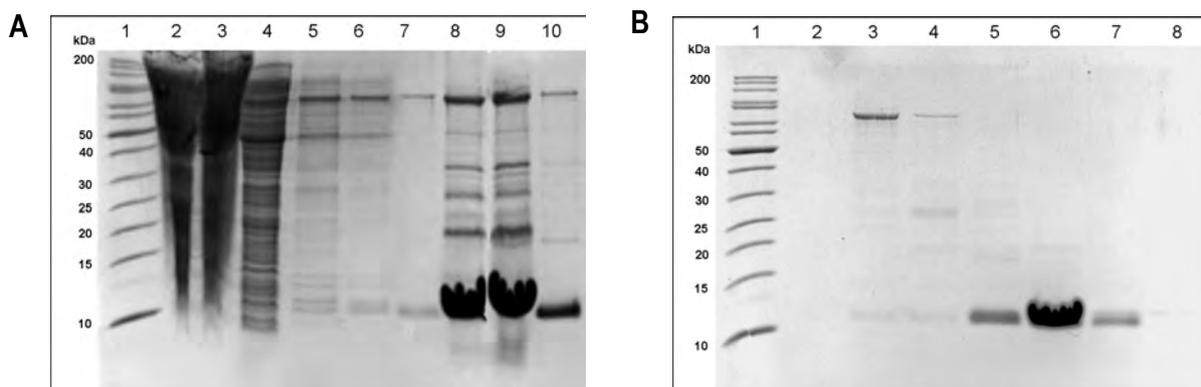
wurde in den ersten Fraktionen (Spur 3-5) in hoher Reinheit erhalten und war über Monate hinweg bei 4°C in 0,5% NLS-Bindungspuffer stabil.



**Abb. 29:** SDS-PAGE mit Fraktionen der subtraktiven Ni-Affinitätschromatographie zur Entfernung von ungeschnittenem His<sub>6</sub>-TatA<sub>d</sub> und freiem His-Tag. Spur 1: Marker (PageRuler™); Spur 2-5 Säulendurchfluß, hier kommt reines TatA<sub>d</sub> ohne His-Tag; Spur 6-8: Waschfraktionen mit Bindungspuffer; Spur 9+10: Elution von His<sub>6</sub>-TatA<sub>d</sub> mit Elutionspuffer.

#### 4.1.2.2. Aufreinigung von TatA<sub>22-70</sub>

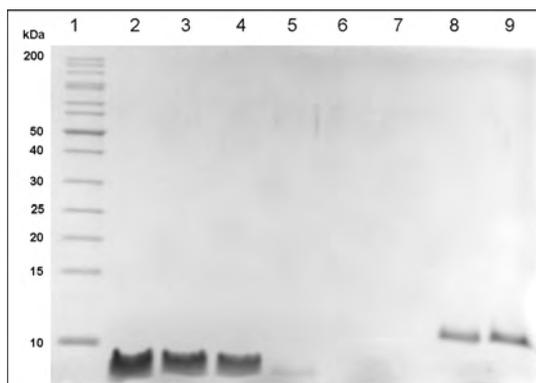
Da das Konstrukt TatA<sub>22-70</sub> den wasserlöslichen Teil von TatA<sub>d</sub> darstellt, wurde kein Detergenz für die Aufreinigung benötigt. Das Protein liegt ausschließlich im Cytosol vor und wird daher nach dem Zellaufschluss direkt aus dem Lysat mittels Ni-Affinitätschromatographie isoliert. Die Fraktionen der Ni-Affinitätschromatographie sind in Abb. 30A gezeigt.



**Abb. 30:** SDS-PAGE (A) Fraktionen der Ni-Affinitätschromatographie zur Isolierung von His<sub>6</sub>-TatA<sub>22-70</sub>. Spur 1: Marker (PageRuler™); Spur 2+3: Säulendurchfluß; Spur 4-7: Waschfraktionen mit Bindungspuffer; Spur 8-10: Elution mit Elutionspuffer. (B) Gelfiltration von His<sub>6</sub>-TatA<sub>22-70</sub>: Spur 1: Marker (PageRuler™); Spur 2: Fraktion 30-40 min; Spur 3: bis 50 min; Spur 4: bis 60 min; Spur 5: bis 70 min; Spur 6: bis 80 min; Spur 7: bis 90 min; Spur 8: bis 100 min; Spur 8: bis 110 min.

Während der Säulendurchfluss den Großteil der Fremdproteine enthält, bindet TatA<sub>22-70</sub> gut an die Säule und die Waschfraktionen (Spuren 4-7) enthalten nur wenig des rekombinanten Proteins. Die Elutionsfraktionen (Spuren 8-10) enthalten neben TatA<sub>22-70</sub> jedoch noch Verunreinigungen und ein weiterer Reinigungsschritt wird benötigt. Die Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie werden lyophilisiert, in Gelfiltrationspuffer wieder aufgelöst und über eine Gelfiltration weiter aufgereinigt. Das SDS-Gel mit den Gelfiltrationsfraktionen ist in Abb. 30B gezeigt. Die vereinten Fraktionen (Spuren 5-7) werden erneut lyophilisiert und das Protein anschließend einer CNBr-Spaltung unterzogen. Nach Entsalzung, einer subtraktiven Ni-Affinitätschromatographie zur Entfernung von ungespaltenem Protein (die Ausbeute der CNBr-Spaltung betrug ca. 70%) und einem abschließenden Entsalzungsschritt wurde reines Protein erhalten, welches lyophilisiert und bei -20°C gelagert wurde.

Abb. 31 zeigt die Fraktionen der subtraktiven Ni-Affinitätschromatographie. Das Protein liegt nach diesem Schritt sauber vor.

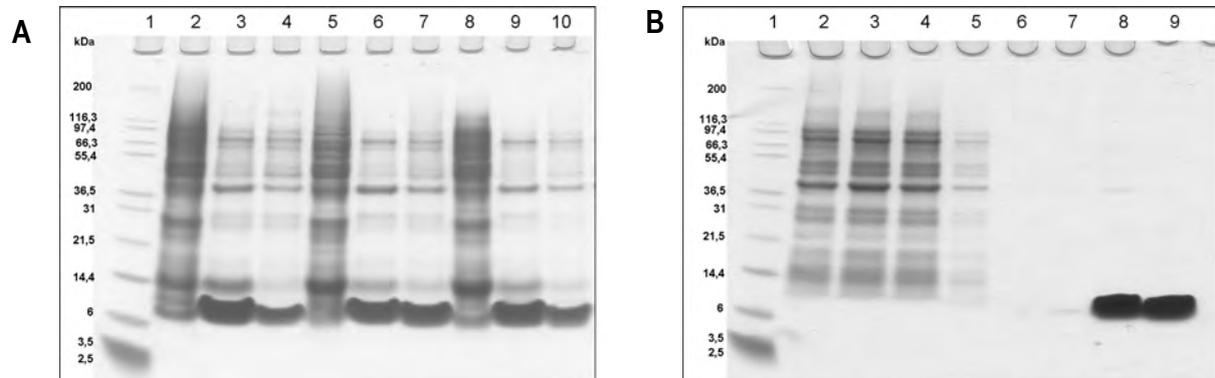


**Abb. 31:** SDS-PAGE mit Fraktionen der subtraktiven Ni-Affinitätschromatographie zur Entfernung von ungeschnittenem His<sub>6</sub>-TatA<sub>22-70</sub> und freiem His-Tag. Spur 1: Marker (PageRuler™); Spur 2-4 Säulendurchfluß, hier kommt reines TatA<sub>22-70</sub> ohne His-Tag; Spur 5-7: Waschfraktionen mit Bindungspuffer; Spur 8+9: Elution von His<sub>6</sub>-TatA<sub>22-70</sub> mit Elutionspuffer.

#### 4.1.2.3. Aufreinigung von TatA<sub>2-45</sub>

TatA<sub>2-45</sub>, das TatA-Konstrukt, dem der stark geladene C-Terminus fehlt, wurde ausschließlich wasserunlöslich in der Membran- und Zelltrümmerfraktion gefunden (siehe SDS-Gel in Abb. 32A). Es wurde aus diesen Fraktionen mit Hilfe des Detergenz NLS herausgelöst, und allen Puffern wurden zur Stabilisierung des Proteins in Lösung 0,5% NLS zugefügt. Nach Entfernung des Detergenz durch Dialyse fiel dieses Konstrukt sofort aus. Abb. 32B zeigt die Isolierung von His<sub>6</sub>-TatA<sub>2-45</sub> mittels Ni-Affinitätschromatographie. Man sieht, dass die TatA<sub>2-45</sub>-haltigen Fraktionen (Spur 8 und 9) bereits sehr rein sind. Durch die Verwendung

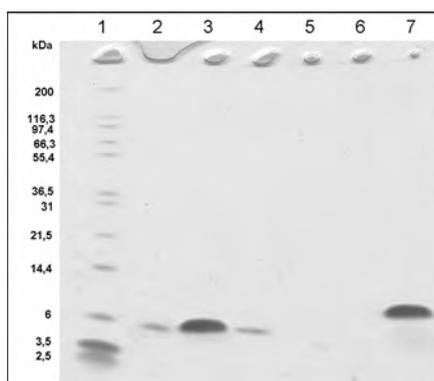
größerer selbst gepackter Säulen (Econo columns, Bio-Rad) konnte bei diesem Konstrukt auf die weitere Aufreinigung durch eine Gelfiltration verzichtet werden.



**Abbildung 32:** SDS-PAGE von TatA<sub>2-45</sub> (A) verschiedene Fraktionen nach der Zellernte. Spur 1: Marker (Mark12™); Spur 2, 5 und 8: Zytosol; Spur 3,6 und 9: Zelltrümmerfraktion; Spur 4,7 und 10: Membranfraktion.

(B) Fraktionen der Ni-Affinitätschromatographie zur Isolierung von His<sub>6</sub>-TatA<sub>2-45</sub>. Spur 1: Marker (Mark12™); Spur 2-4: Säulendurchfluß; Spur 5-7: Waschfraktionen mit Bindungspuffer; Spur 8-9: Elution von His<sub>6</sub>-TatA<sub>2-45</sub> mit Elutionspuffer.

Nach Entfernung des Detergenz mittels Dialyse wurde eine CNBr-Spaltung mit einer Ausbeute von ca. 65% durchgeführt. Die Elutionsfraktionen der subtraktiven Ni-Affinitätschromatographie, welche noch einen großen Anteil ungeschnittenen His<sub>6</sub>-TatA<sub>2-45</sub> enthalten, werden dialysiert, lyophilisiert und erneut einer CNBr-Spaltung unterzogen.



**Abb. 33:** SDS-PAGE mit Fraktionen der subtraktiven Ni-Affinitätschromatographie zur Entfernung von ungeschnittenem His<sub>6</sub>-TatA<sub>2-45</sub> und freiem His-Tag. Spur 1: Marker (Mark12™); Spur 2-4 Säulendurchfluß, hier kommt reines TatA<sub>2-45</sub> ohne His-Tag; Spur 5-7: Waschfraktionen mit Bindungspuffer; Spur 8+9: Elution von His<sub>6</sub>-TatA<sub>2-45</sub> mit Elutionspuffer.

TatA<sub>2-45</sub>, welches im letzten Reinigungsschritt in detergenzhaltigem Bindungspuffer vorliegt, wird in Dialyseschläuchen (MWCO = 2,5 kDa) dialysiert, wobei es ausfällt, und anschließend lyophilisiert. Pulverförmiges TatA<sub>2-45</sub> kann bei -20°C gelagert werden.

### 4.1.3. Charakterisierung mittels MALDI-MS

Mittels MALDI-MS wurden die hergestellten Proteine auf ihre Identität, Reinheit und den Erfolg der Markierung geprüft. Tabelle 8 fasst die gerundeten Durchschnittsmassen der verschiedenen uniform markierten und unmarkierten Konstrukte zusammen.

**Tabelle 8:** Massen (*average mass*) der verschiedenen  $^{15}\text{N}$ -markierten und unmarkierten Proteine in Da. Die Massen wurden mit ExPASy Peptide Mass [119] berechnet

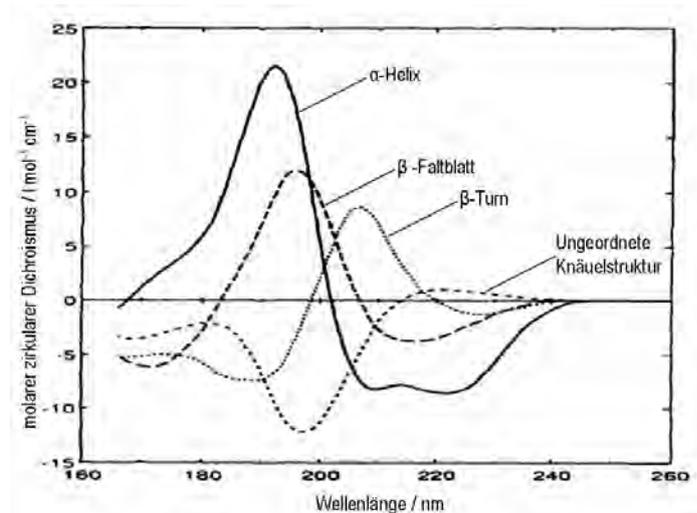
	His <sub>6</sub> -TatA <sub>d</sub>	TatA <sub>d</sub>	His <sub>6</sub> -TatA <sub>2-45</sub>	TatA <sub>2-45</sub>	His <sub>6</sub> -TatA <sub>22-70</sub>	TatA <sub>22-70</sub>
Unmarkiert	8829	7299	6847	4683	7307	5144
Uniform $^{15}\text{N}$ -markiert	8943	7368	6939	4738	7408	5207

Die Massenspektren der TatA-Konstrukte zeigen, dass die richtigen Proteine in hoher Reinheit erhalten wurden und die uniformen  $^{15}\text{N}$ -Markierungen erfolgreich waren. Die Spektren der nicht markierten und der uniform  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteine befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

## 4.2. CD-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur von TatA<sub>d</sub> wurde das gesamte Protein TatA<sub>d</sub>, sowie die TatA-Konstrukte TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub> in Phospholipidvesikel und andere membranimitierende Umgebungen eingebettet und CD-Spektren gemessen. Außerdem wurde die Hitzestabilität von TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>d</sub> in SDS-Mizellen untersucht.

In Abb. 34 sind zum Vergleich charakteristische Linienformen verschiedener Sekundärstrukturelemente gezeigt.



**Abb. 34:** Charakteristische CD-Spektren unterschiedlicher Sekundärstrukturelemente. Verändert übernommen aus [81].

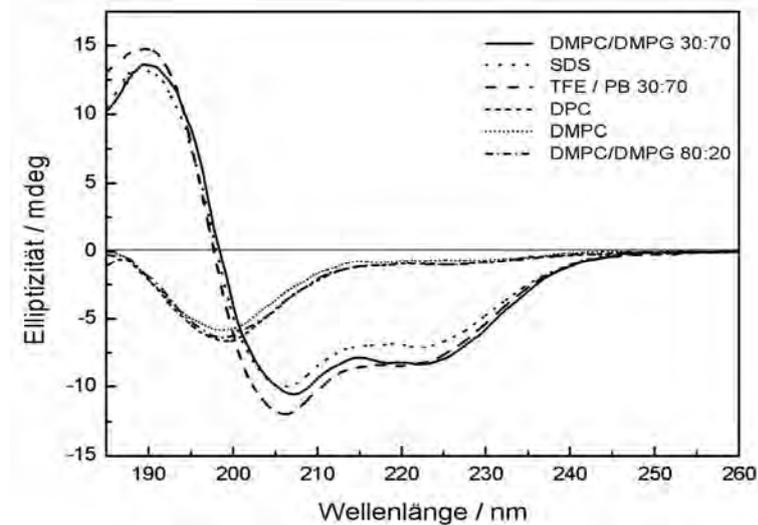
### 4.2.1. CD-Spektroskopie an TatA<sub>22-70</sub>

Abb. 35 zeigt die CD-Spektren von TatA<sub>22-70</sub> in verschiedenen Detergenz-Mizellen, verschiedenen Lipid-Vesikeln und in 30% TFE. Alle Proben wurden in Natriumphosphat-Puffer (PB) zubereitet und haben einen neutralen pH-Wert von 7,0.

Man sieht deutlich, dass sich die Linienformen der Spektren in zwei Gruppen einteilen lassen. CD-Spektren von TatA<sub>22-70</sub> in zwitterionischen Detergenz-Mizellen (DPC), Vesikeln (DMPC) und gemischten Vesikeln mit niedrigem Anteil des negativ geladenen Lipids DMPG (DMPC:DMPG = 80:20) zeigen eine negative Bande bei 198 nm, jedoch keine positive Intensität. Diese Linienform ist charakteristisch für ein unstrukturiertes Polypeptid. Die CD-Spektren von TatA<sub>22-70</sub> in negativ geladener Umgebung hingegen, in SDS-Mizellen und Vesikeln mit hohem Anteil an DMPG (DMPC:DMPG = 30:70), zeigen eine starke positive Bande bei 190 nm und zwei negative Banden bei 203 nm und 222 nm.

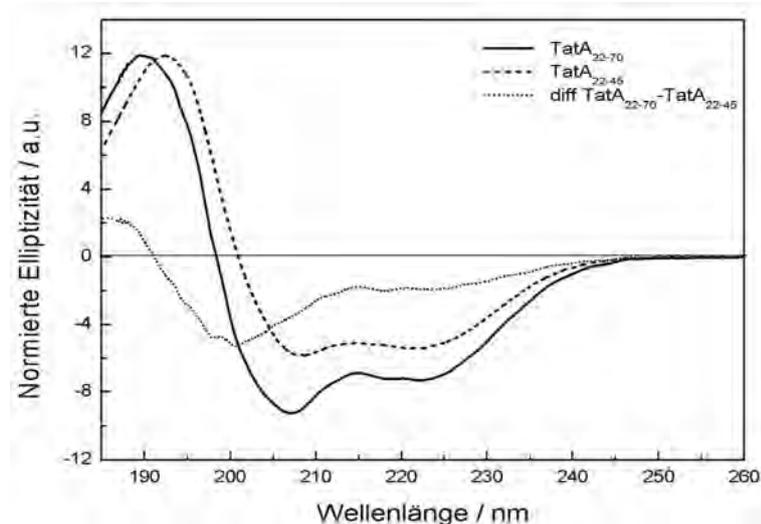
Die Linienform dieser Spektren ist dem CD-Spektrum von TatA<sub>22-70</sub> in 30% TFE, welches dafür bekannt ist,  $\alpha$ -helikale Strukturen in Polypeptiden zu induzieren [120], sehr ähnlich und

zeigt, dass TatA<sub>22-70</sub> unter diesen Bedingungen eine Struktur mit deutlichem  $\alpha$ -helikalen Anteil annimmt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TatA<sub>22-70</sub> eine negativ geladene Umgebung benötigt um sich korrekt zu falten.



**Abb. 35:** CD-Spektren von TatA<sub>22-70</sub> in verschiedenen membranimitierenden Umgebungen: in SDS- und DPC-Mizellen, in DMPC-Vesikeln und DMPC/DMPG-Vesikeln verschiedener Zusammensetzung und in 30% TFE.

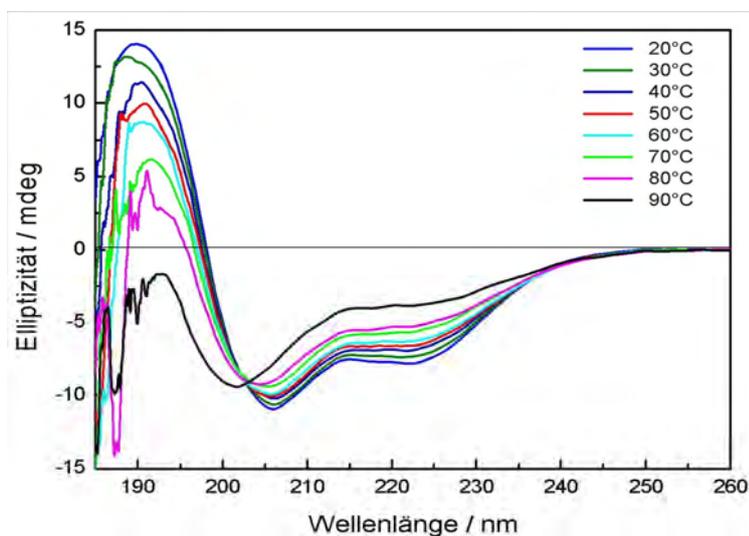
Das CD-Spektrum von TatA<sub>22-70</sub> in DMPC/DMPG-Vesikeln (30:70) wurde mit dem CD-Spektrum eines weiteren TatA-Fragments in der gleichen Umgebung, dem von TatA<sub>22-45</sub> verglichen. Dieses Konstrukt wurde von Dipl.-Chem. Torsten Walther im Arbeitskreis hergestellt und wird hier zum Vergleich und zur Stützung meiner Ergebnisse gezeigt. TatA<sub>22-45</sub> stellt den kurzen amphiphilen Mittelteil des Proteins TatA<sub>d</sub> dar (Rest 22-45), wobei der geladene C-Terminus fehlt. Die gemessenen CD-Spektren und das berechnete Differenzspektrum der Konstrukte TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>22-45</sub> sind in Abb. 36 gezeigt.



**Abb. 36:** Vergleich der CD-Spektren von TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>22-45</sub>. Das Differenzspektrum der beiden Konstrukte gleicht dem charakteristischen CD-Spektrum eines unstrukturierten Polypeptids.

Das Differenzspektrum besitzt ein Minimum nahe bei 200 nm und ist charakteristisch für ein ungefaltetes Polypeptid. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass die C-terminale Region von TatA<sub>d</sub> (Position 45-70), wie basierend auf Aminosäuresequenzanalysen vorhergesagt, unstrukturiert ist

Abb. 37 zeigt CD-Spektren von TatA<sub>22-70</sub> in SDS-Mizellen bei Temperaturen zwischen 20° und 90°, welche gemessen wurden um die Hitzestabilität dieses Konstrukts zu ermitteln. Erst bei 90°C verliert TatA<sub>22-70</sub> seine  $\alpha$ -helikale Struktur und zeigt das typische Spektrum einer ungeordneten Polypeptidkette.

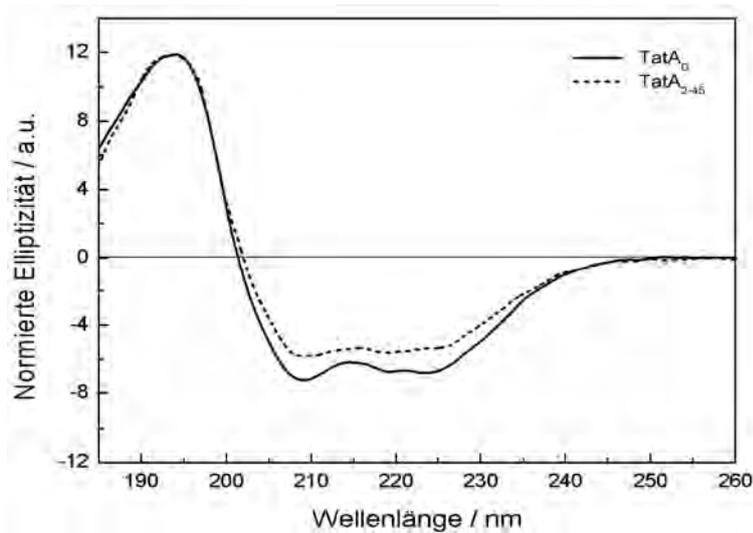


**Abb. 37:** CD-Spektren von TatA<sub>22-70</sub> in SDS-Mizellen, gemessen bei Temperaturen zwischen 20°C und 90°C.

#### 4.2.2. CD-Spektroskopie an TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub>

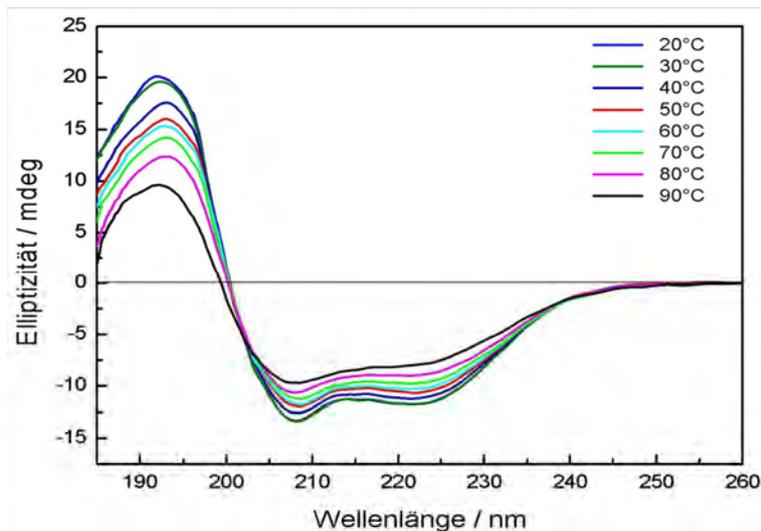
Da die CD-Spektren von TatA<sub>22-70</sub> die Notwendigkeit einer anionischen Umgebung für eine korrekte Faltung zeigten (siehe Abschn. 4.2.1.), wurden TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub> in gemischten Vesikeln mit einem DMPC:DMPG-Verhältnis von 30:70 rekonstituiert.

In Abb. 38 werden die CD-Spektren von TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub> verglichen. Beide Proteine zeigen einen deutlichen  $\alpha$ -helikalen Strukturanteil. Die leichte Blauverschiebung des Spektrums von TatA<sub>d</sub> ist mit einem unstrukturierten Anteil (Beinhalten der C-terminalen Region) konsistent.



**Abbildung 38:** CD-Spektren von TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub> in DMPC/DMPG-Vesikeln (30:70) in Natriumphosphat-Puffer.

Eine Temperaturreihe von TatA<sub>d</sub> zeigt, dass das Protein in SDS-Mizellen selbst bei 90°C noch  $\alpha$ -helikale Anteile besitzt und nicht vollständig denaturiert ist (siehe Abb. 39).

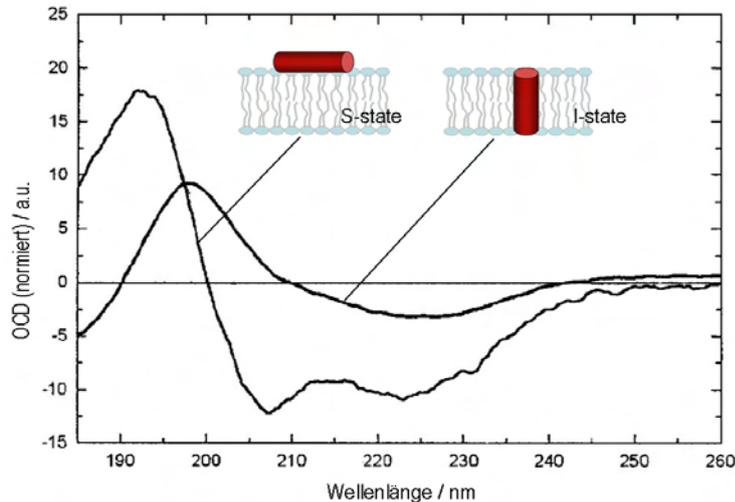


**Abbildung 39:** CD-Spektren von TatA<sub>d</sub> in SDS-Mizellen, gemessen bei Temperaturen zwischen 20°C und 90°C.

### 4.3. OCD-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Topologie von TatA<sub>d</sub> wurden orientierte Circular Dichroismus (OCD)-Spektren aller TatA-Konstrukte gemessen. Mittels OCD-Spektroskopie kann die Orientierung von  $\alpha$ -Helices in einer makroskopisch zum Lichtstrahl orientierten Lipidmembran qualitativ bestimmt werden. Hierbei kann zwischen einer transmembranen Helix (*inserted state, I-state*) und einer Helix auf der Membranoberfläche (*surface state, S-state*) unterschieden werden. Für

beide Orientierungen werden charakteristische Linienformen erhalten, wie in Abb. 40 gezeigt. Die Linienformen der verschieden orientierten Helixsegmente unterscheiden sich hauptsächlich in der An- bzw. Abwesenheit einer Bande bei ca. 209 nm.



**Abb. 40:** Charakteristische OCD-Linienformen für  $\alpha$ -Helices mit verschiedener Ausrichtung in einer orientierten Modellmembran (nach Chen, Lee und Huang, 2002 [121]).

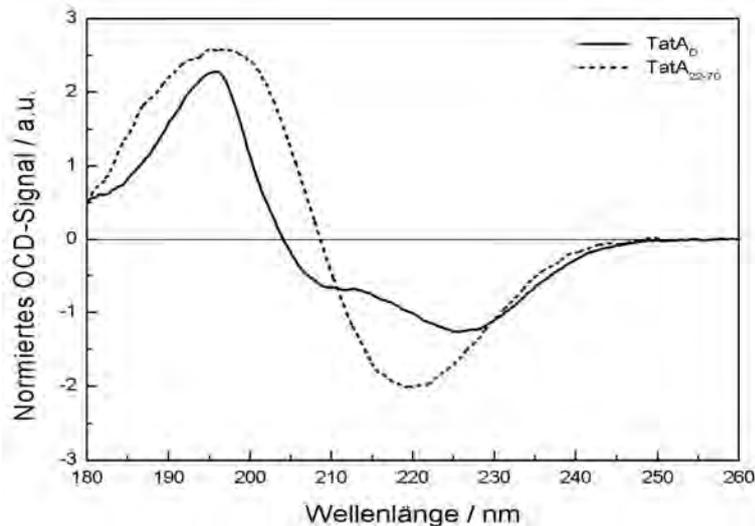
Die Proteinfragmente TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub> sowie das gesamte Protein TatA<sub>d</sub> wurden in Lipiddoppelschichten, bestehend aus den Lipiden DMPC und DMPG im Verhältnis 30:70 orientiert, vermessen und mit weiteren, in der Arbeitsgruppe hergestellten TatA-Konstrukten verglichen.

#### 4.3.1. OCD-Spektroskopie an TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>22-70</sub>

Der Graph in Abb. 41 zeigt die OCD-Spektren von TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>22-70</sub> in orientierten DMPC/DMPG-Doppelschichten. In dem OCD-Spektrum von TatA<sub>d</sub> ist eine Bande bei 209 nm vorhanden, jedoch mit geringerer Intensität als für eine rein transmembrane Helix typisch. Es handelt sich um eine Kombination beider charakteristischer Linienformen (für *I-state* und *S-state*) aus Abb. 37, was in guter Übereinstimmung mit dem erwarteten Spektrum für TatA<sub>d</sub> ist: eine Überlagerung der Linie für eine N-terminale Transmembranhelix (*I-state*) mit der einer parallel zur Membranoberfläche eingebetteten Helix (*S-state*). Die vorhergesagte Topologie von TatA<sub>d</sub> wird durch das gemessene OCD-Spektrum bestätigt.

Das OCD-Spektrum von TatA<sub>22-70</sub> weicht von den für  $\alpha$ -Helices charakteristischen Linienformen ab und ähnelt eher OCD-Spektren, die für Proteine mit  $\beta$ -Faltblattstruktur in der Literatur zu finden sind [122,123]. Möglicherweise ist bei der Probenvorbereitung eine  $\beta$ -Aggregation aufgetreten, was für amphiphile Peptide bereits TFE-induziert beobachtet

wurde [124]. Es wurde jedoch selbst mit verschiedenen anderen Rekonstituierungsmethoden (Rekonstituierung aus Vesikeln, verschiedene Lipidzusammensetzungen) immer die gleiche Linienform mit einer breiten positiven Bande im Bereich von 185-205 nm und einem Minimum bei 218 nm erhalten.



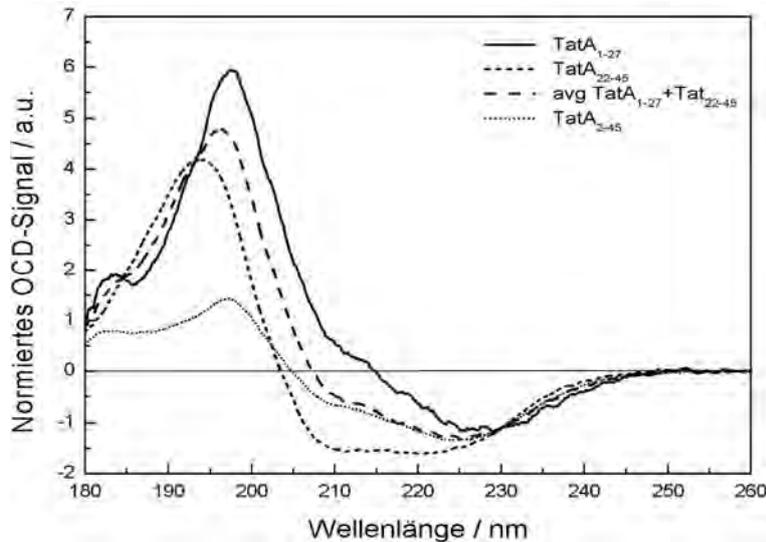
**Abb. 41:** OCD-Spektren von TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>22-70</sub> in DMPC/DMPG (30:70) im Protein zu Lipid-Verhältnis von P:L = 1:100. Die Spektren wurden bei 30°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97,0 % gemessen.

#### 4.3.2. OCD-Spektroskopie an TatA<sub>2-45</sub>

TatA<sub>2-45</sub> weist ein ähnliches OCD-Spektrum auf wie TatA<sub>d</sub>. Neben einer positiven Bande bei 198 nm ist eine negative Bande bei 209 nm vorhanden, sie ist jedoch weniger intensiv als die negative Bande bei 227 nm. Dies deutet ebenfalls auf ein „Mischspektrum“ hin, welches aus der Überlagerung der Linienformen einer transmembranen und einer oberflächlichen  $\alpha$ -Helix resultiert.

Um zu sehen, ob sich das OCD-Spektrum von TatA<sub>2-45</sub>, durch Spektren der einzelnen Helices rekonstruieren lässt, wurden die kurzen  $\alpha$ -helikalen Fragmenten TatA<sub>1-27</sub> und TatA<sub>22-45</sub> gemessen und mit TatA<sub>2-45</sub> verglichen. Das Konstrukt TatA<sub>1-27</sub> wurde von Dr. Christian Lange im Arbeitskreis hergestellt und zeigt ein OCD-Spektrum mit typischer Linienform für eine membrandurchspannende Helix (*I-state*), in der die Bande bei 209 nm weitgehend verschwunden ist. Das amphiphile Fragment TatA<sub>22-45</sub> (hergestellt von Dipl.-Chem. Torsten Walther) zeigt eine ausgeprägte Bande bei 209 nm, charakteristisch für eine parallel zur Membranoberfläche liegende  $\alpha$ -Helix. Es wurde ein Kombinationsspektrum aus diesen beiden Fragmenten berechnet, welches in dem relevanten spektralen Bereich eine gute Übereinstimmung mit dem OCD-Spektrum von TatA<sub>2-45</sub> aufweist (siehe Abb. 42). Dies zeigt,

dass sich die kurzen Fragmente (Rest 1-27 + Rest 22-45) des Proteins genauso in der Membran verhalten, wie das aus ihnen kombinierte Konstrukt (Rest 2-45).



**Abb. 42:** OCD-Spektren von TatA<sub>2-45</sub> und den  $\alpha$ -helikalen Segmenten TatA<sub>1-27</sub> und TatA<sub>22-45</sub> in DMPC/DMPG (30:70) im Protein zu Lipid-Verhältnis 1:100. Die Spektren wurden bei 30°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97,0 % gemessen. Außerdem ist das berechnete Kombinationsspektrum von TatA<sub>1-27</sub> und TatA<sub>22-45</sub> abgebildet.

Die Spektren wurden so normiert, dass sie bei 230 nm dieselbe Intensität haben, so dass die Linienformen gut verglichen werden können. Die absoluten Proteinkonzentrationen konnten weder kolorimetrisch (z. B. nach der Bradford oder der Lowry-Methode) mit genügender Präzision bestimmt werden noch durch UV-Absorptionsspektrometrie, da TatA<sub>d</sub> keine absorbierenden Reste (Trp, Tyr, Cys) besitzt.

## 4.4. Flüssigkeits- NMR

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

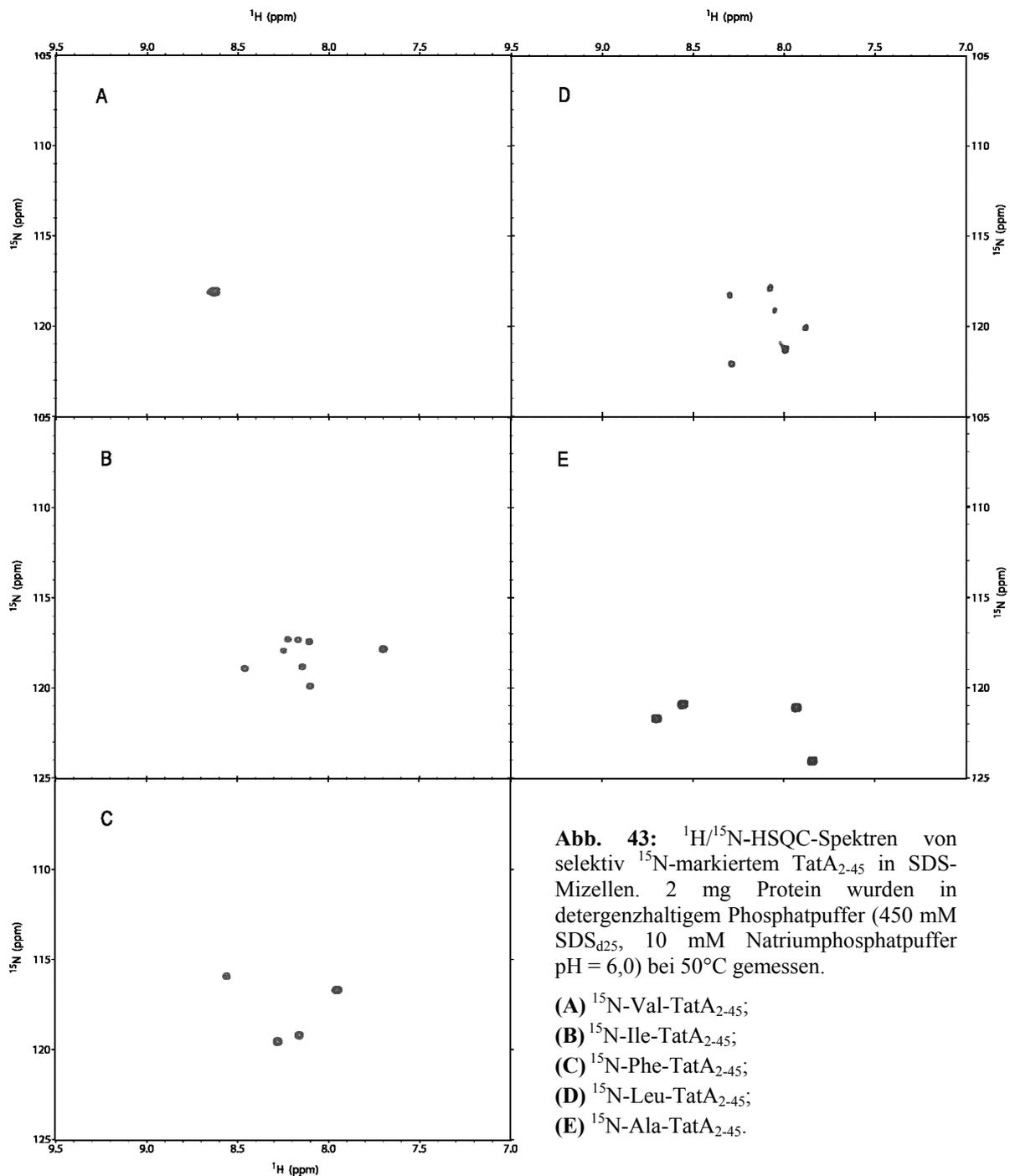
Mittels zweidimensionaler  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*)-NMR-Experimente von uniform  $^{15}\text{N}$ -markierten Protein-Proben, lässt sich die Qualität (Faltung, Anzahl der vorliegenden Konformationen) und Identität (Anzahl der Aminosäuren) eines Proteins untersuchen.  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschexperimente können zusätzlich Informationen über die Sekundärstruktur und Topologie eines Membranproteins in Detergenz-Mizellen liefern, indem sie Aussagen über den Schutz von Amidprotonen durch Wasserstoffbrückenbindungen oder durch die Mizelle vor einem Austausch mit Deuterium (nicht sichtbar im HSQC-Spektrum) zulassen [125,126].  $\alpha$ -Helices im Inneren einer Mizelle (hydrophobe Transmembranhelices) sind am stärksten geschützt und tauschen zuletzt aus. Ihre Signale sind daher im HSQC-Spektrum selbst einer 90%  $\text{D}_2\text{O}$ -haltigen Probe noch sichtbar. Oberflächengebundene  $\alpha$ -Helices besitzen schnellere Austauschraten, können jedoch bei geringerem  $\text{D}_2\text{O}$  Gehalt noch im Spektrum auftauchen, da sie teils durch die Mizelle, teils durch starke Wasserstoffbrücken geschützt sein können.

Durch Messung der selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierten Proben kann einerseits der Erfolg der Markierung geprüft werden, andererseits kann das Spektrum des uniform markierten Proteins durch Vergleich mit den Signalpositionen der selektiv markierten Proteine bereits teilweise zugeordnet werden.

#### 4.4.1.1. HSQC-Spektroskopie an selektiv $^{15}\text{N}$ -markiertem $\text{TatA}_{2-45}$

Die  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierten  $\text{TatA}_{2-45}$ -Proben,  $^{15}\text{N}$ -Val- $\text{TatA}_{2-45}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Ile- $\text{TatA}_{2-45}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Phe- $\text{TatA}_{2-45}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Leu- $\text{TatA}_{2-45}$  und  $^{15}\text{N}$ -Ala- $\text{TatA}_{2-45}$  sind in Abb. 40 zu sehen. Die Aminosäuresequenz von  $\text{TatA}_{2-45}$  beinhaltet ein Valin, 8 Isoleucine, 6 Leucine, 4 Phenylalanine und 4 Alanine (siehe Abb. 44). Abb. 43A zeigt das HSQC-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -Valin-markiertem  $\text{TatA}_{2-45}$ . Das Spektrum zeigt erwartungsgemäß einen einzigen Peak, da genau ein Valin in der Sequenz von  $\text{TatA}_{2-45}$  vorhanden ist. Das  $^{15}\text{N}$ -Ile- $\text{TatA}_{2-45}$ -Spektrum in Abb. 43B weist 8 Signale auf, in Übereinstimmung mit den 8 Isoleucinen der  $\text{TatA}_{2-45}$ -Primärsequenz. Auch in den restlichen HSQC-Spektren passt die Anzahl der NMR-Signale mit der Anzahl der markierten Aminosäuren in der Sequenz zusammen. Die HSQC-Spektren der selektiv markierten Proben beweisen damit, dass die Markierung in allen Fällen

erfolgreich verlaufen ist und selbst bei Alanin kein *scrambling* aufgetreten ist, was hierfür besonders anfällig ist.

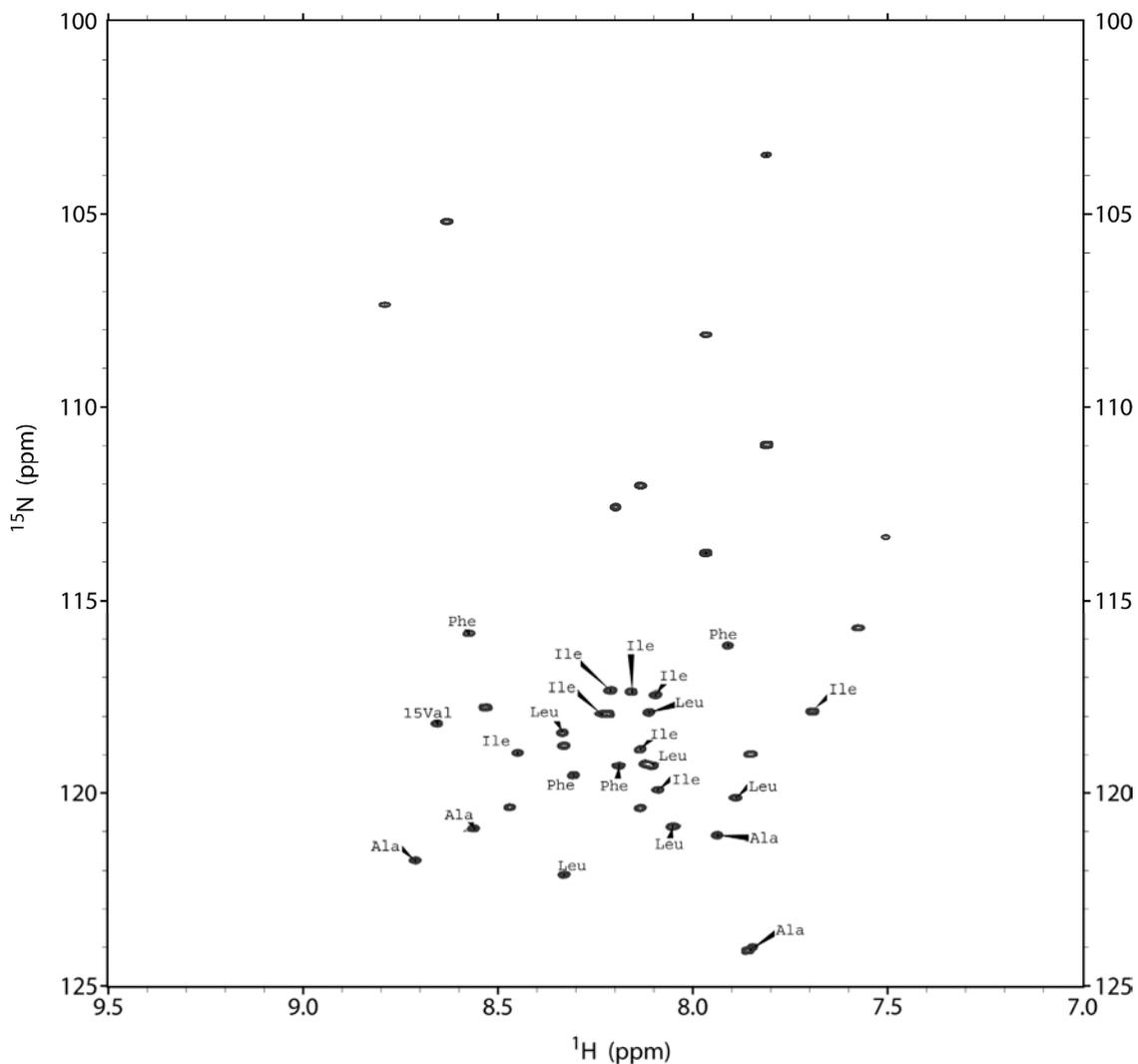


**Abb. 44:** Primärsequenz von TatA<sub>2-45</sub>, die  $^{15}\text{N}$ -markierten Aminosäuren sind jeweils unterlegt. Die Sequenz besitzt 1 V, 8 I, 6 L, 4 F und 4 A.

#### 4.4.1.2. HSQC-Spektroskopie an uniform $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>2-45</sub>

Das  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>2-45</sub> ist in Abb. 45 gezeigt. Anhand der spektralen Dispersion und der Linienform der NMR-Peaks ist zu erkennen, dass das Protein gut gefaltet ist. Es tritt keine Peak-Verdopplungen auf, dies weist darauf hin, dass das Protein in nur einer Konformation vorliegt. Es sind 39 gut aufgelöste Signale zu erkennen. Die Sequenz von TatA<sub>2-45</sub> besteht aus 44 Aminosäuren, davon 3 Pro, die in einem  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum aufgrund des fehlenden Amidprotons nicht sichtbar sind. Es fehlen also nur 2 Signale, welche wahrscheinlich aufgrund von Überlappung nicht sichtbar sind. Eine Peakliste mit der genauen Position der Signale befindet sich im Anhang.

Durch Vergleich mit den HSQC-Spektren der selektiv markierten Proben konnte bereits eine partielle Zuordnung der Signale zu Aminosäuretypen durchgeführt werden.

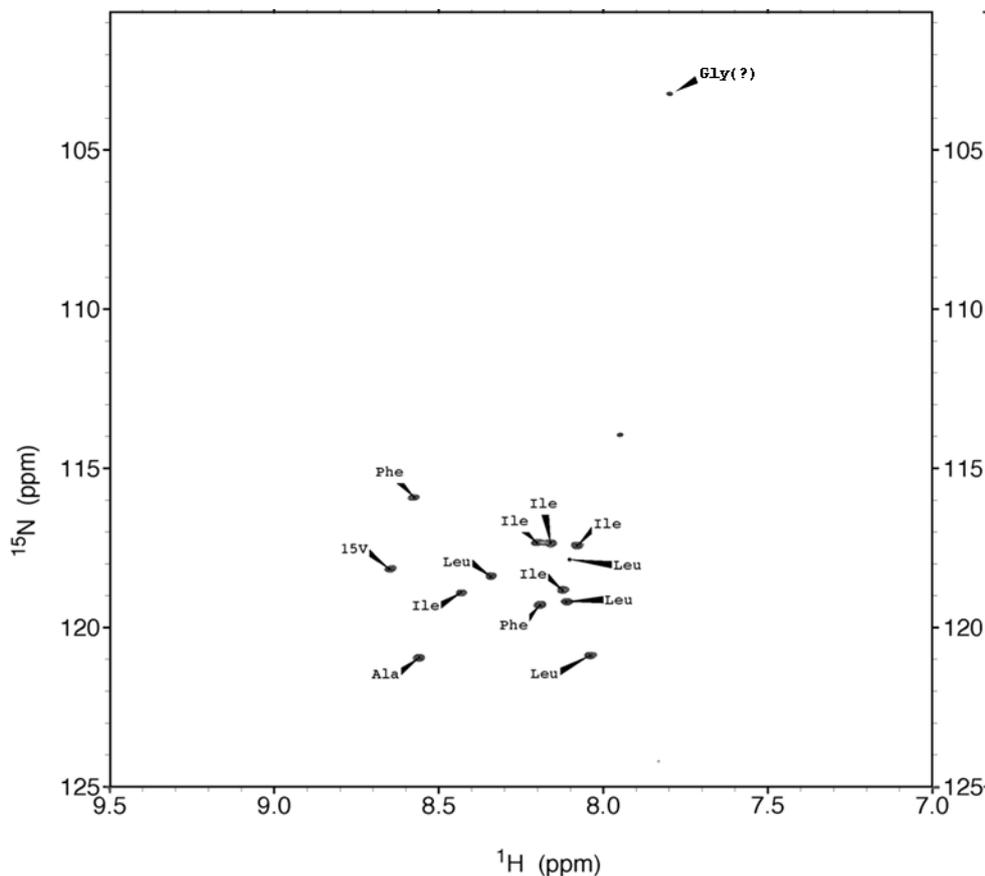


**Abb. 45:**  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>2-45</sub> in SDS-Mizellen. 2 mg Protein wurden in detergenzhaltigem Phosphatpuffer (450 mM SDS<sub>d25</sub>, 10 mM Natriumphosphatpuffer pH=6,0) bei 50°C gemessen.

#### 4.4.1.3. H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O-Austauschexperimente an uniform <sup>15</sup>N-markiertem TatA<sub>2-45</sub>

Wie schon weiter oben erwähnt, ist es mit Hilfe von H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O-Austauschexperimenten möglich, die Topologie von Membranproteinen in SDS-Mizellen zu untersuchen. Die uniform <sup>15</sup>N-markierte TatA<sub>2-45</sub>-Probe wurde nach der Messung in 90% H<sub>2</sub>O, 10% D<sub>2</sub>O lyophilisiert und anschließend in 90% D<sub>2</sub>O, 10% H<sub>2</sub>O wieder gelöst.

Das <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum dieser Probe wurde unter den gleichen Bedingungen wie die vorhergehenden HSQC-Spektren (T = 50°C, pH = 6,0) gemessen und ist in Abb. 46 gezeigt. Es sind nur noch 15 Signale vorhanden, alle anderen Amidprotonen tauschen offensichtlich schnell mit D<sub>2</sub>O aus. Man kann davon ausgehen, dass die übrig gebliebenen Amidprotonen durch starke Wasserstoffbrücken und durch die Detergenz-Mizelle geschützt sind und zu einer transmembranen  $\alpha$ -Helix gehören. Ein Großteil der Signale (außer zweien) kann durch Vergleich mit den genauen Resonanzen der selektiv markierten Proben einem bestimmten Aminosäuretyp zugeordnet werden (siehe Abb. 43 und 45). Bei dem Signal bei ca. 7,8 ppm <sup>1</sup>H und 103 ppm <sup>15</sup>N chemischer Verschiebung handelt es sich vermutlich um ein Glycin, da diese Aminosäure oft Resonanzfrequenzen in diesem relativ tiefen <sup>15</sup>N-Frequenzbereich besitzt.



**Abb. 46:** <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC-Spektren von uniform <sup>15</sup>N-markiertem TatA<sub>2-45</sub> in SDS-Mizellen in 90% D<sub>2</sub>O/10% H<sub>2</sub>O. 2 mg Protein wurden in detergentenhaltigem Phosphatpuffer (450 mM SDS<sub>d25</sub>, 10 mM Natriumphosphatpuffer pH=6,0) bei 50°C gemessen.

## 4.5. Festkörper-NMR

### 4.5.1. Festkörper-NMR-Spektroskopie an TatA<sub>22-70</sub>

#### 4.5.1.1. <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie zur Bestimmung der optimalen Bedingungen zur Orientierung der Proteine in Phospholipiddoppelschichten

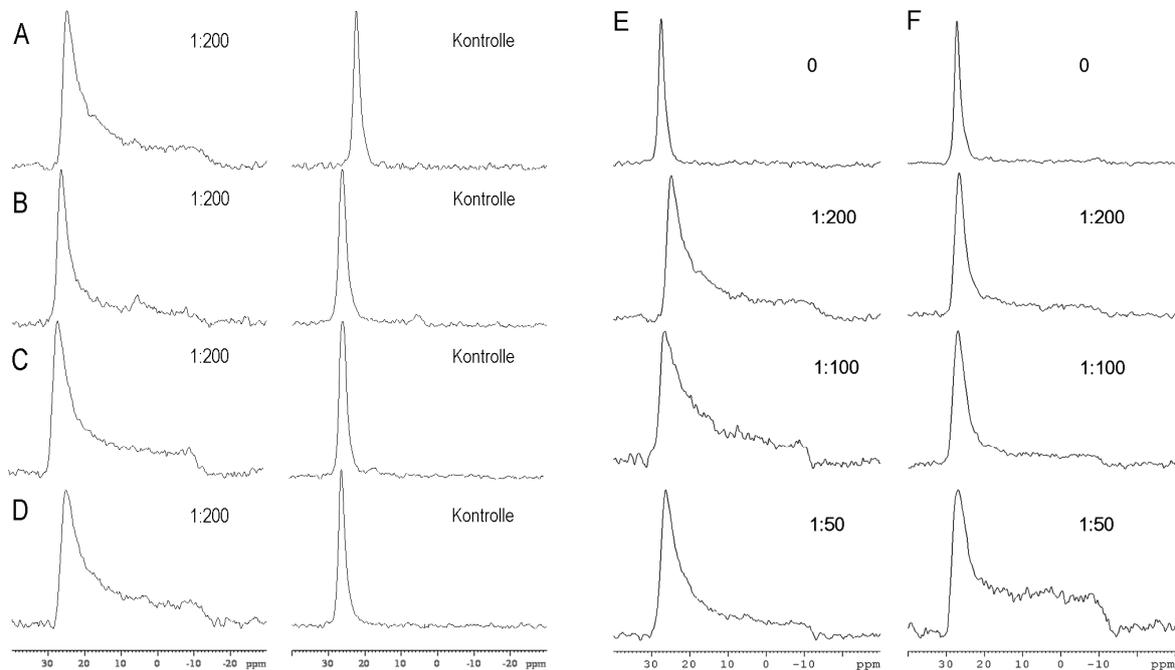
In der Festkörper-NMR-Spektroskopie werden, im Gegensatz zur NMR in Flüssigkeit, anisotrope Wechselwirkungen nicht ausgemittelt. Um die Spektren, welche in der Festkörper-NMR breite, einander überlappende Linien besitzen, zu vereinfachen, werden die Proben makroskopisch relativ zum Magnetfeld orientiert.

Reine Lipiddoppelschichten können auf ebenen Glasplatten durch vorsichtiges Antrocknen und Rehydratisierung leicht orientiert werden, jedoch ist die Orientierung von proteinhaltigen Modellmembranen eine größere Herausforderung. Mit Hilfe von <sup>31</sup>P-NMR-Experimenten kann die Orientierung der Lipidkopfgruppen gemessen werden. Damit ist eine Optimierung der Bedingungen für orientierte proteinhaltige Proben auch mit unmarkiertem Protein möglich.

Für TatA<sub>22-70</sub> wurden verschiedene Methoden der Rekonstituierung erprobt, darunter die Rekonstituierung aus Vesikeln und durch Kosolubilisierung des Proteins mit Lipiden in verschiedenen organischen Lösungsmitteln. Hierbei musste ein Lösungsmittelgemisch gewählt werden, in welchem sowohl die Lipide als auch das Protein löslich sind. Als Lipide wurde ein Gemisch aus 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (POPC) und 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)] (Natriumsalz) (POPG) im Verhältnis 30:70 gewählt. Das Verhältnis zwischen zwitterionischen Phosphocholin- und anionischen Phosphoglycerol-Kopfgruppen wurde aufgrund der Ergebnisse der CD-Messungen (Abschn. 4.2.1.) als das am besten geeignete Modell gewählt. Die ungesättigten Oleoyl-Lipidketten wurden verwendet, da diese Lipide eine niedrigere Phasenübergangstemperatur als Di-Myristoyl-Lipide besitzen und das Protein so, während der Hydratisierung, die oberhalb der Phasenübergangstemperatur erfolgen muss, zu schonen.

Abb. 47 A-D zeigt <sup>31</sup>P-NMR-Spektren der verschiedenen erprobten Orientierungsmethoden. Mit allen hier gezeigten Methoden wurde eine uniaxiale Orientierung der Phospholipide mit der Membrannormale parallel zu B<sub>0</sub> erzielt, was daran sichtbar ist, dass sich die Hauptintensität der Spektren zwischen 20 und 30 ppm befindet, links von der isotropen Position (etwa 0 ppm). Der schmalste Peak und damit die beste Orientierung wurde durch

Kosolubilisierung von Protein und Lipid in Methanol (Abb. 47A, links) und in 80% TFE/ 20% H<sub>2</sub>O bidest. (Abb. 47B, links) erzielt.



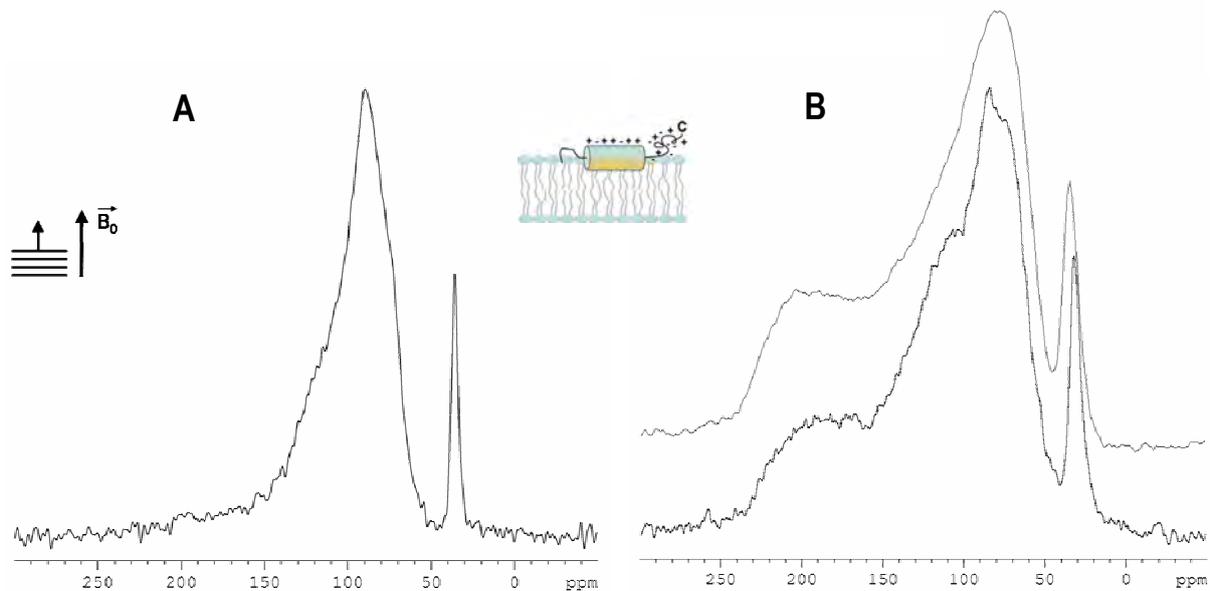
**Abb. 47:** <sup>31</sup>P-NMR-Spektren von TatA<sub>22-70</sub> in POPC/POPG (30:70)-Doppelschichten auf Glasplättchen, rekonstituiert mit verschiedenen Methoden (A-D) und in verschiedenen Protein-Lipid-Verhältnissen (E,F). Die Rekonstituierungsmethoden wurden im Verhältnis P:L = 1:200 erprobt (A-D, linke Spalte) und jeweils mit der Kontrolle ohne Protein verglichen (A-D, rechte Spalte). (A) Kosolubilisierung in Methanol; (B) Kosolubilisierung in 80% TFE, 20% H<sub>2</sub>O bidest.; (C) Kosolubilisierung in CH<sub>3</sub>Cl:MeOH=1:2; (D) Rekonstituierung aus Vesikeln in H<sub>2</sub>O bidest. (E) Kosolubilisierung in Methanol in P:L-Verhältnissen von 0, 1:200, 1:100 und 1:50; (F) Kosolubilisierung in 80% TFE, 20% H<sub>2</sub>O bidest. in P:L-Verhältnissen von 0, 1:200, 1:100 und 1:50.

In den <sup>31</sup>P-NMR-Spektren in Abb. 47 E-F wird das günstigste Protein-Lipid-Verhältnis (P:L) für die Rekonstituierung durch Kosolubilisierung in Methanol (Abb. 47E) und in 80% TFE/ 20% H<sub>2</sub>O bidest. (Abb. 47F) getestet. Der beste Kompromiss aus guter Orientierung und möglichst großer Menge an Protein wurde durch die Methode mit 80% TFE/ 20% H<sub>2</sub>O bidest. und einem P:L = 1:100 gefunden. Diese Parameter wurden für die folgenden Messungen von TatA<sub>22-70</sub> in orientierten Phospholipiddoppelschichten verwendet.

#### 4.5.1.2. 1D $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie

Nach der erfolgreichen Etablierung der Orientierungsmethode konnte im nächsten Schritt schließlich das  $^{15}\text{N}$ -markierte Protein vermessen werden.

Mittels eindimensionaler  $^{15}\text{N}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie kann die Qualität der Orientierung des  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteins in orientierten Lipiddoppelschichten direkt abgelesen werden.



**Abb. 48:**  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>22-70</sub> in POPC/POPG (30:70) **(A)** in orientierten Phospholipiddoppelschichten auf Glasplättchen (die Membrannormale ist parallel zum Magnetfeld  $B_0$  orientiert); **(B)** in unorientierten Proteoliposomen (unten) und als lyophilisiertes Pulver (oben).

Abb. 48A zeigt das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von TatA<sub>22-70</sub> in orientierten POPC/POPG-Doppelschichten. Zum Vergleich sind in Abb. 48B Pulverspektren von  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>22-70</sub> in unorientierten Liposomen bzw. darüber, von lyophilisiertem  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>22-70</sub>-Pulver, abgebildet. In den Pulverspektren reichen die Resonanzen über die gesamte Spannweite des CSA-Tensors vom  $^{15}\text{N}$ -Amidstickstoff (60-220 ppm), wobei das Spektrum der Proteoliposomen aufgrund ihrer Beweglichkeit und der daraus resultierenden Ausmittelung etwas schmäler als das des lyophilisierten Pulvers ist. Im  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum der orientierten TatA<sub>22-70</sub>-Probe hingegen sind alle Signale in einem Bereich von 70-140 ppm konzentriert. Typischerweise besitzen transmembran orientierte  $\alpha$ -Helices, die in Lipidschichten mit der Membrannormale parallel zum Magnetfeld orientiert sind, anisotrope chemische Verschiebungen in einem Bereich von 150-200 ppm, wohingegen planar orientierte  $\alpha$ -Helices Signale im Bereich von 70-100 ppm aufweisen [68].

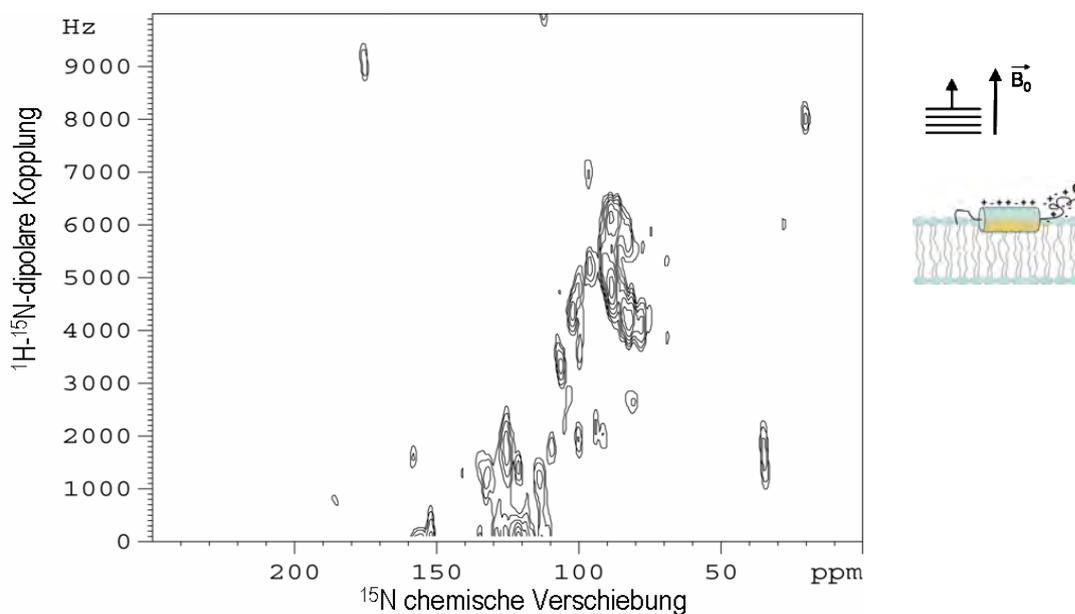
Das Spektrum von TatA<sub>22-70</sub> zeigt demnach keine senkrecht zur Membranoberfläche orientierten N-H-Bindungen und zeigt eindeutig, dass die amphiphile Helix von TatA<sub>22-70</sub>

parallel in die Membranoberfläche eingebettet ist. Allerdings dehnt sich die Intensität weiter zu höheren chemischen Verschiebungen aus (bis etwa 140 ppm), als für eine exakt parallel orientierte Helix zu erwarten wäre. Dies weist darauf hin, dass die Helix leicht geneigt sein könnte. Signale um die isotrope Position (100-130 ppm) können jedoch auch von beweglichen Resten (eventuell von dem unstrukturierten C-Terminus des Proteins stammen). Der Peak bei ca. 35,7 ppm stammt von Aminogruppen der Seitenkette und des N-Terminus.

#### 4.5.1.3. 2D Korrelationsspektroskopie (PISEMA)

Das PISEMA-Spektrum von uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>22-70</sub> in orientierten Phospholipiddoppelschichten ist in Abb. 49 zu sehen. Eine  $\alpha$ -Helix zeigt in einem PISEMA-Spektrum ein charakteristisches ringförmiges Muster (*PISA-wheel*), dessen Ausdehnung und genaue Position im Spektrum durch die Neigung der  $\alpha$ -Helix in der Membran gegeben wird (vgl. Abschn. 1.3.3.2.). Während transmembrane  $\alpha$ -Helices (orientiert in Modellmembranen, deren Normale parallel zu  $B_0$  positioniert wurde) *PISA-wheels* mit  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebungen zwischen 150 und 200 ppm und dipolare  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Kopplungen zwischen 2 und 10 kHz besitzen, weisen parallel zur Membranoberfläche orientierte  $\alpha$ -Helices *PISA-wheel*-Signalmuster mit  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungen zwischen 70 und 100 ppm und dipolaren  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Kopplungen zwischen 0 und 5 kHz auf [68].

Das PISEMA-Spektrum von TatA<sub>22-70</sub> besitzt zwar kein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis, aber ein ringförmiges Signalmuster deutet sich im Bereich von 80-105 ppm und 2-5 kHz an.



**Abb. 49:**  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -PISEMA-NMR-Spektrum von uniform markiertem  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>22-70</sub> in orientierten Phospholipiddoppelschichten (DMPC:DMPG = 30:70) auf Glasplättchen.

Dieser spektrale Bereich spricht eindeutig für Peptidbindungen, die parallel zur Membranoberfläche lokalisiert sind. Es tritt hingegen keine Intensität in einem Bereich auf, der für eine transmembrane  $\alpha$ -Helix typisch ist.

Die Intensität um die isotrope Position bei 120 ppm und 0 Hz stammt möglicherweise von dem sich schnell (relativ zur NMR-Zeitskala von 10-100 ms) bewegenden unstrukturierten C-Terminus des Proteins. Das Signal bei 35 ppm und 1,3 kHz stammt von Aminogruppen der Seitenketten und des C-Terminus.

#### 4.5.1.4. Simulationen

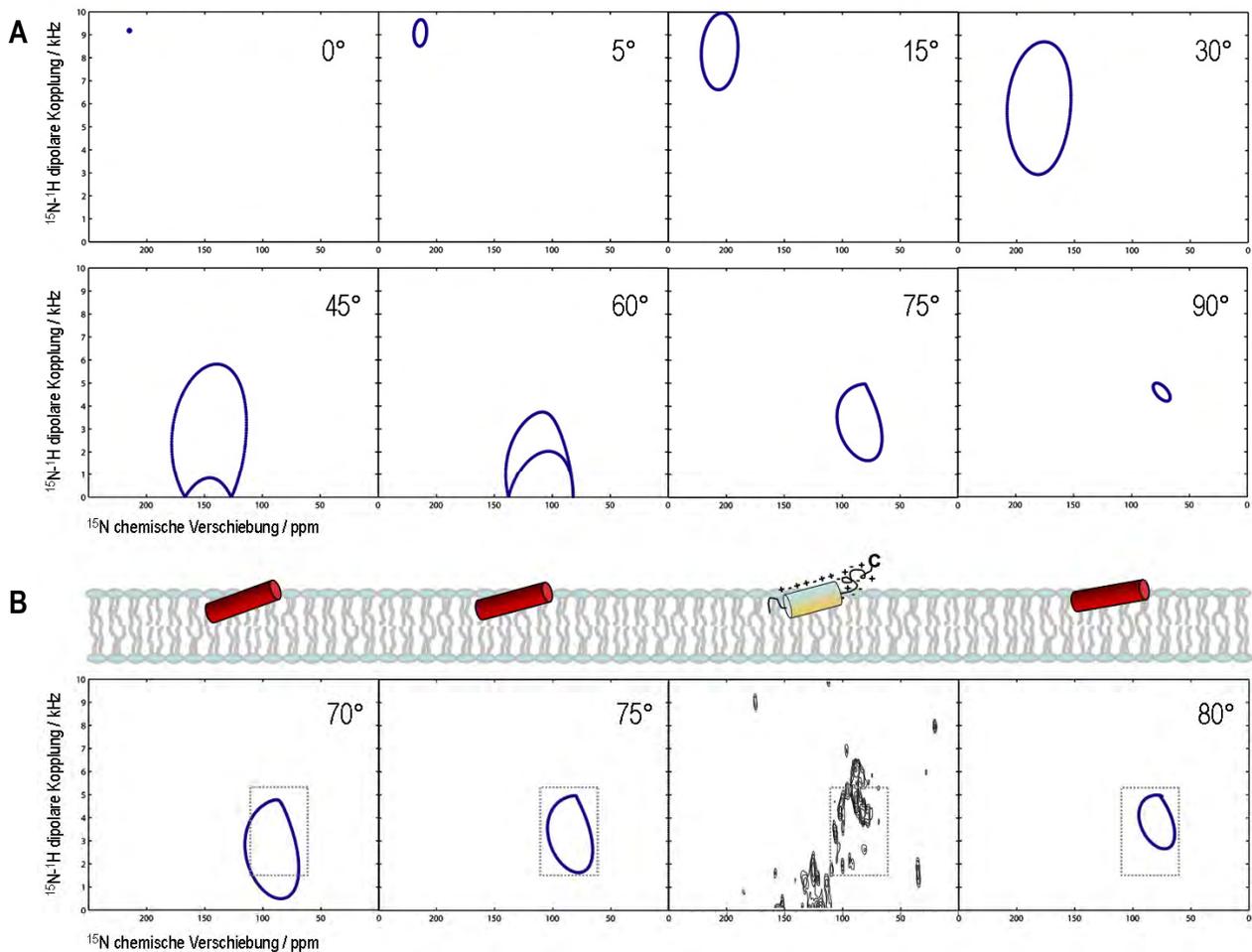
Festkörper-NMR-Spektren von Modellproteinen lassen sich mit Hilfe der Winkelabhängigkeit der Resonanzfrequenzen berechnen.

Abb. 50A zeigt berechnete PISEMA-Spektren für ideale  $\alpha$ -Helices, die mit Kippwinkeln  $\tau$  zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$  von der Membrannormale geneigt sind. Die Membrannormale ist in diesem Fall parallel bezüglich des externen Magnetfelds. Die idealen  $\alpha$ -Helices besitzen einheitliche Diederwinkel ( $\Phi = -60,7^\circ$  und  $\Psi = -44,7^\circ$ ), eine Periodizität von 3,6 Aminosäuren pro Windung, eine N-H Bindungslänge von  $1,07 \text{ \AA}$  und einem Ordnungsparameter, der ihre Beweglichkeit charakterisiert, von  $S = 1$  (siehe Abschn. 1.3.3.2.).

Das PISEMA-Spektrum von TatA<sub>22-70</sub> zeigt ein ringförmiges Signalmuster, das in dem spektralen Bereich einer um  $75^\circ$  von der Membrannormale geneigten idealen  $\alpha$ -Helix mit einem Ordnungsparameter von  $S = 1$  liegt. Schon die PISA-*wheels* für  $\tau = 70^\circ$  und  $\tau = 80^\circ$  zeigen andere spektrale Bereiche auf, was in Abb. 50B verdeutlicht wird.

Eine detailliertere Auswertung der Helixorientierung wird hier nicht für sinnvoll erachtet, da systematische Fehler bei dieser Messung nicht ganz zu vermeiden sind und außerdem große statistische Fehler auftraten. Eine Fehlerbetrachtung wird in Abschn. 4.5.2.6. durchgeführt.

Das Ergebnis einer oberflächengebundenen Helix mit  $\tau \approx 75^\circ$  ist im Einklang mit der Amphiphilie des Segments und dem vorhergesagten Topologiemodell von TatA.



**Abb. 50:** Berechnete PISEMA-Spektren für ideale  $\alpha$ -Helices mit verschiedenen Kippwinkeln  $\tau$ , einheitlichen Diederwinkeln ( $\Phi = -60,7^\circ$  und  $\Psi = -44,7^\circ$ ), Hauptachsenwerten des  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebungstensors von  $\sigma_{11} = 64$  ppm,  $\sigma_{22} = 77$  ppm und  $\sigma_{33} = 222$  ppm, einem Winkel zwischen der Hauptachse des  $^{15}\text{N}$ -CSA-Tensors ( $\sigma_{33}$ ) und dem N-H-Bindungsvektor von  $\delta = 18,5^\circ$ , einer N-H Bindungslänge von  $1,07$  Å und einem Ordnungsparameter von  $S = 1$ . (A)  $\tau$  zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$ ; (B) Vergleich des experimentellen PISEMA-Spektrums von TatA<sub>22-70</sub> mit Simulationen für ideale  $\alpha$ -Helices mit  $\tau = 70^\circ, 75^\circ$  und  $80^\circ$ . Der spektrale Bereich der Intensität des Ringmusters im experimentellen Spektrum ist zum Vergleich in allen vier Spektren mit einem Rechteck markiert.

#### 4.5.2. Festkörper-NMR-Spektroskopie von TatA<sub>2-45</sub>

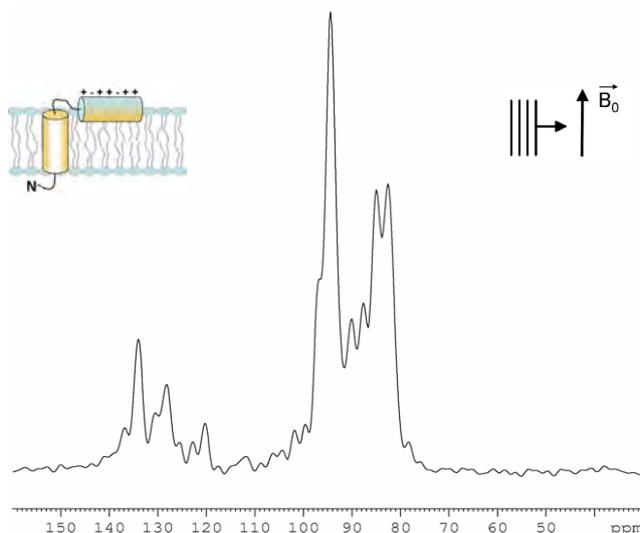
Für das Proteinfragment TatA<sub>2-45</sub>, welches die Transmembranhelix enthält und welchem lediglich die C-terminale Region von TatA<sub>d</sub> fehlt, konnten Bizellen als Modellmembran verwendet werden. Magnetisch orientierte Bizellen eignen sich besonders gut für die Festkörper-NMR-Spektroskopie, da in der Regel besser aufgelöste Spektren erhalten werden (siehe Abschn. 1.3.1.).

TatA<sub>2-45</sub> wurde in Bizellen (DMPC/DMPG/6-O-PC, DMPC:DMPG = 80:20,  $q = 3,2$ ) gemessen. Da sich Bizellen mit ihrer Normalen senkrecht zum magnetischen Feld orientieren (*perpendicular bicelles*), sind alle anisotropen chemischen Verschiebungen verglichen mit

denen der Proben auf Glasplättchen (in denen die Membrannormale parallel zum Magnetfeld steht) um die isotrope Position bei 120 ppm gespiegelt und um den Faktor 2 gestaucht (siehe Abschn. 1.3.3.2., Gleichung 7).

#### 4.5.2.1. 1D $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie an uniform $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>2-45</sub>

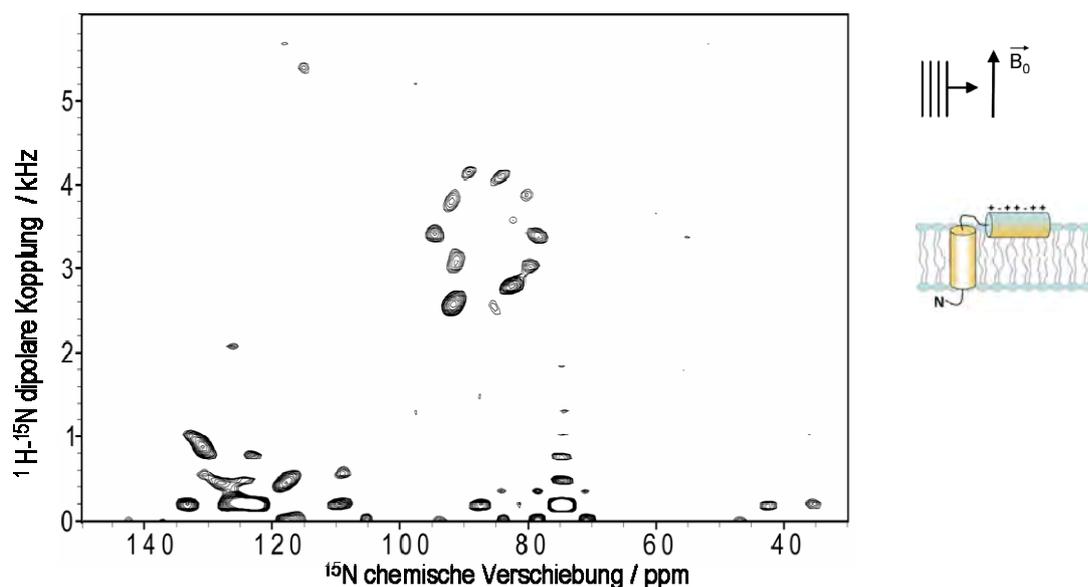
Abb. 51 zeigt das eindimensionale  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von uniform markiertem  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>2-45</sub> in magnetisch orientierten Bizellen. Das Spektrum besitzt eine hohe Auflösung, ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis und ist charakteristisch für ein orientiertes Protein mit einer Transmembranhelix und einem membranoberflächengebundenen Segment. Die Signale überlappen in zwei spektralen Regionen: Signale, die im rechten Bereich des Spektrums (80-98 ppm  $^{15}\text{N}$  anisotrope chemische Verschiebung) auftreten, stammen von senkrecht zur Membranoberfläche orientierten (transmembranen) Bereichen des Proteins, wohingegen im linken spektralen Bereich (120-138 ppm) parallel zur Membranoberfläche orientierte Anteile des Proteins zu sehen sind. Die scharfen Signale und die breite Lücke zwischen den beiden Signalgruppen, in der die Intensität bis auf die Basislinie zurückgeht, zeigen, dass die Probe eine sehr gute Orientierung besitzt. Jedes einzelne Proteinmolekül ist mit gleichem Winkel relativ zum äußeren Magnetfeld orientiert. Das Spektrum weist keinen Pulveranteil auf, der von aggregiertem, ungefaltetem oder anders orientiertem Protein herrühren würde. Des Weiteren ist kaum Intensität bei der isotropen Verschiebung bei 120 ppm vorhanden, was zeigt, dass das Protein keine sich schnell (isotrop) bewegende Anteile besitzt.



**Abb. 51:**  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von uniform markiertem  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>2-45</sub> in magnetisch orientierten Bizellen (DMPC:DMPG=80:20/ 6-O-PC,  $q = 3,2$ ) bei  $T = 42^\circ$ .

#### 4.5.2.2. 2D Korrelationsspektroskopie an uniform $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>2-45</sub> (SAMMY)

Das SAMMY-Experiment, welches eine verbesserte Version von PISEMA ist und die  $^{15}\text{N}$  chemische Verschiebung mit der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dipolaren Kopplung korreliert, ermöglicht eine weitere Auflösung der Signale in der zweiten Dimension. Das SAMMY-Spektrum von uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>2-45</sub> in Bizellen ist in Abb. 52 zu sehen. Das Spektrum zeigt ein gut aufgelöstes PISA-wheel im Bereich von 78-95 ppm  $^{15}\text{N}$  chemische Verschiebung und 2,52-4,13 kHz  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dipolare Kopplung. Dieses charakteristische Muster in diesem spektralen Bereich beweist eindeutig eine transmembrane  $\alpha$ -Helix. Das Spektrum (welches gut reproduzierbar war) zeigt außerdem, dass das Protein in einer einzigen Konformation mit wohl definierter Faltung und Orientierung relativ zum Magnetfeld vorliegt, da für jedes einzelne Amid-Stickstoffatom genau ein Signal erhalten wurde. Die Signale rechts der isotropen Position bei 120 ppm stammen von  $^{15}\text{N}$ -Atomen aus Amid-N-H-Bindungen, die parallel zur Membranoberfläche orientiert sind, während Signale zwischen 100 und 120 ppm wahrscheinlich der *Loop*-Region zwischen beiden Helices zugeordnet werden können. Ein zweites PISA-wheel, welches die Existenz der zweiten, amphiphilen  $\alpha$ -Helix beweisen würde, ist nicht erkennbar. Dies könnte jedoch daher rühren, dass die Parameter der Messung (Protonen-*offset*, Hartmann-Hahn-Bedingung) nicht auf diesen spektralen Bereich optimiert waren und das Spektrum in diesem Bereich daher eine schlechtere Auflösung bzw. Signal-zu-Rausch-Verhältnis besitzt.



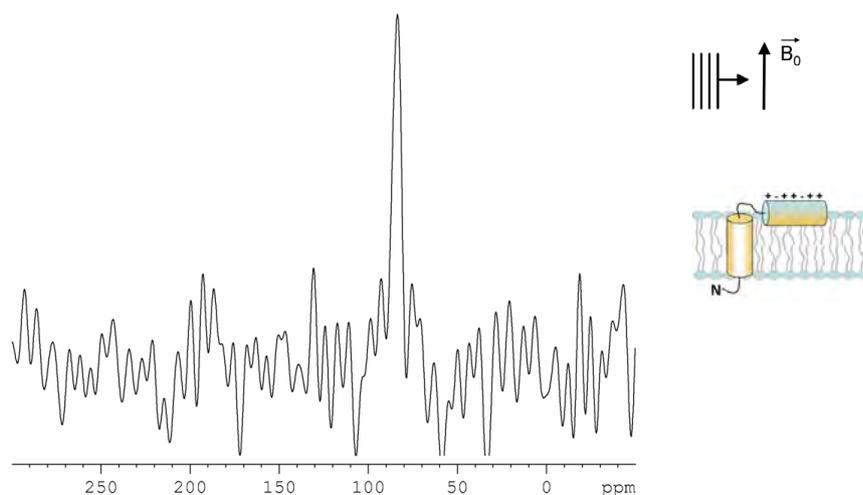
**Abb. 52:** SAMMY-NMR-Spektrum von uniform markiertem  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>2-45</sub> in magnetisch orientierten Bizellen (DMPC:DMPG = 80:20/ 6-O-PC,  $q = 3,2$ ) bei  $T = 42^\circ$ .

Das PISA-*wheel* des SAMMYs zeigt 12 Signale, von denen wahrscheinlich mindestens 2 Signale (92 ppm, 2,5 kHz; 82 ppm, 2,8 kHz) durch Überlappen zweier Peaks zustande gekommen sind. Dies deutet auf eine kurze, ca. 14-16 Reste beinhaltenden Transmembranhelix hin (Prolin ist im SAMMY-Spektrum aufgrund des fehlenden Amidprotons grundsätzlich nicht sichtbar). Die Analyse der genauen Position des PISA-*wheels* erlaubt die quantitative Bestimmung des Kippwinkels der Helix in der Membran und wird weiter unten in Abschn. 4.5.2.5. diskutiert.

Eine Liste der Signalpositionen und Linienbreiten des PISA-*wheels* befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

#### 4.5.2.3. 1D $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie an selektiv markiertem $^{15}\text{N}$ -Val-TatA<sub>2-45</sub>

Das eindimensionale  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von selektiv mit  $^{15}\text{N}$ -Valin markiertem TatA<sub>2-45</sub> in magnetisch orientierten Bizellen wurde unter den gleichen Bedingungen wie das der uniform markierten Probe gemessen und ist in Abb. 53 zu sehen. Das Spektrum zeigt einen einzelnen Peak bei einer anisotropen chemischen Verschiebung von 83 ppm. Da nur ein einziges Valin in der Sequenz von TatA<sub>2-45</sub> vorkommt (vgl. Abb. 44), steht das Ergebnis mit dem erwarteten Spektrum im Einklang. Die Position des Signals, rechts der isotropen Position zeigt bereits, dass sich Val15 in der transmembranen Region des Proteins befinden muss und bestätigt damit die Annahme, dass die Transmembranhelix von TatA<sub>d</sub> N-terminal lokalisiert ist.



**Abb. 53:**  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von selektiv markiertem  $^{15}\text{N}$ -Val-TatA<sub>2-45</sub> in magnetisch orientierten Bizellen (DMPC:DMPG = 80:20/ 6-O-PC,  $q = 3,2$ ) bei  $T = 42^\circ$ .

#### 4.5.2.4. 2D Korrelationsspektroskopie an selektiv $^{15}\text{N}$ -Val-markiertem TatA<sub>2-45</sub> (SAMMY)

Das SAMMY-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -Val-TatA<sub>2-45</sub> zeigt wie erwartet ein einzelnes Signal bei 83 ppm und 3,6 kHz (siehe Abb. 54). Durch Vergleich dieses Spektrums mit dem SAMMY der uniform markierten Probe, kann ein Peak des PISA-*wheels* zugeordnet und daraus die Phase der transmembranen  $\alpha$ -Helix in ihrer Lipidumgebung bestimmt werden.

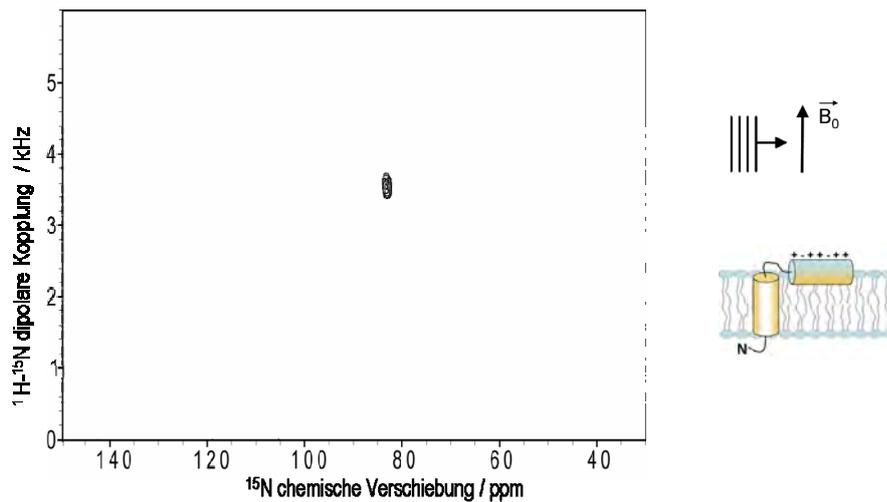


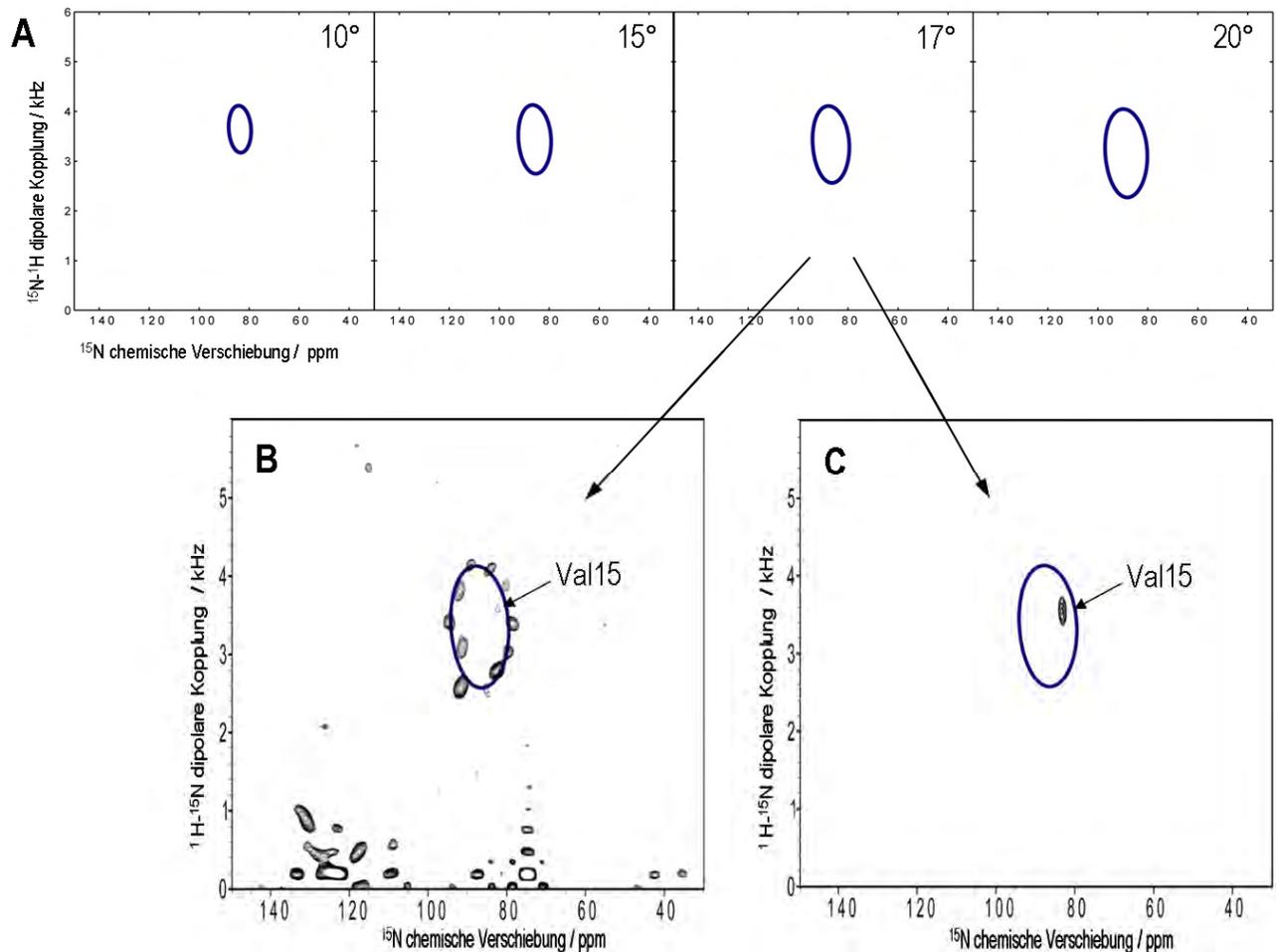
Abb. 54: SAMMY-NMR-Spektrum von selektiv markiertem  $^{15}\text{N}$ -Val-TatA<sub>2-45</sub> in magnetisch orientierten Bizellen (DMPC:DMPG = 80:20/ 6-O-PC,  $q = 3,2$ ) bei  $T = 42^\circ$ .

#### 4.5.2.5. Simulationen

Wie schon weiter oben erwähnt, (Abschn. 4.5.1.4.) ist es möglich, NMR-Spektren von  $\alpha$ -Helices bestimmter Orientierung zu simulieren und durch Vergleich der berechneten Ringmuster mit dem experimentell erhaltenen PISA-*wheel* die Orientierung (Neigungs- und Drehwinkel) der untersuchten Helix zu bestimmen.

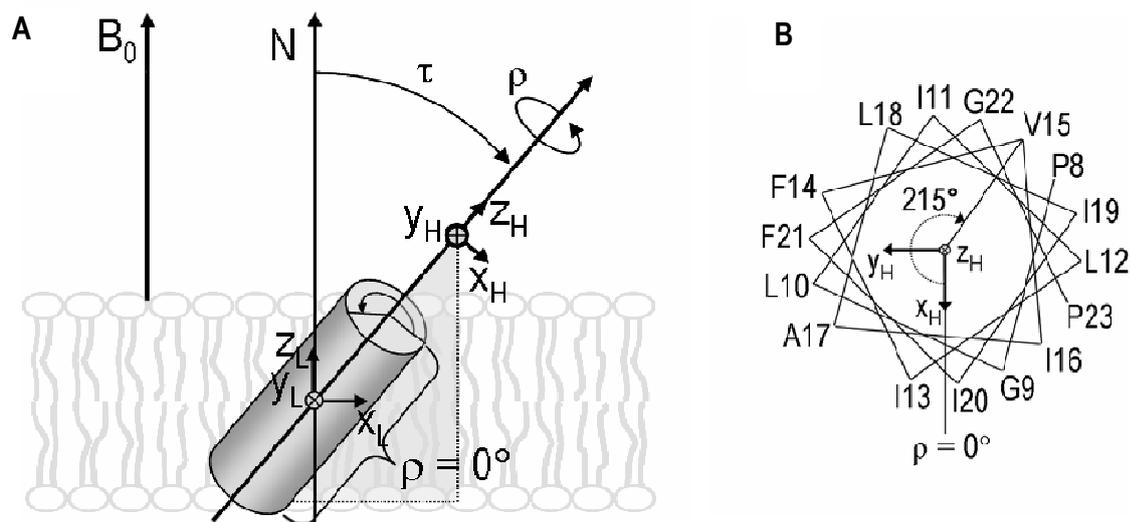
Abb. 55A zeigt die berechneten NMR-Spektren idealer  $\alpha$ -Helices mit  $\tau = 10^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $17^\circ$  und  $20^\circ$  und einem Ordnungsparameter von  $S = 0,83$ . Für die Simulation der Spektren wurden die gleichen Parameter wie in Abschn. 4.5.1.4. verwendet. Allerdings wurde die senkrechte Orientierung der Bizellenprobe berücksichtigt und die Resonanzen der CSA und der Dipol-Aufspaltung wie in Abschn. 1.3.3.2. beschrieben skaliert (vgl. Gleichung 7).

Das experimentelle PISA-*wheel* der Transmembranhelix von TatA<sub>2-45</sub> stimmt sehr gut mit der Simulation einer idealen  $\alpha$ -Helix mit einer Neigung von  $\tau = 17^\circ$  überein. Bereits eine Änderung des Kippwinkels um  $3^\circ$  verschlechterte die Übereinstimmung.



**Abb. 55:** Simulationen zur Bestimmung des Kippwinkels  $\tau$ . (A) Berechnete SAMMY-Spektren idealer Helices mit einer Neigung von  $10^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $17^\circ$  und  $20^\circ$  von der Membrannormalen in senkrechten Bizellen (die Membrannormale steht hier senkrecht zum Magnetfeld  $B_0$ ). (B) Überlagerung des berechneten Spektrums für eine ideale  $\alpha$ -Helix mit den Diederwinkeln  $\Psi = -44,7^\circ$  und  $\Phi = -60,7^\circ$ , einem Kippwinkel  $\tau = 17^\circ$  und einem Ordnungsparameter von  $S = 0,83$  mit dem experimentellem Spektrum von uniform markiertem  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>2-45</sub> (C) mit selektiv markiertem  $^{15}\text{N}$ -Va-TatA<sub>2-45</sub>. Die Zuordnung des Valins (B) ist mit einem Pfeil markiert.

In Abb. 55B und 55C ist das simulierte NMR-Spektrum der um  $17^\circ$  geneigten idealen  $\alpha$ -Helix mit den experimentellen Daten von uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>2-45</sub> und selektiv  $^{15}\text{N}$ -Valin-markiertem TatA<sub>2-45</sub> überlagert. Das Signal des Val15 in dem PISA-wheel der uniform markierten Probe konnte durch Vergleich der chemischen Verschiebung und der Dipol-Dipol-Kopplung des Signals im Spektrums der  $^{15}\text{N}$ -Valin-markierten Probe identifiziert werden und ist in Abb. 55B mit einem Pfeil markiert. Durch diese Zuordnung konnte mit Hilfe eines Simulationsprogramms die Phase (der azimuthale Rotationswinkel) der Transmembranhelix bestimmt werden.



**Abbildung 56:** (A) Definition der Winkel  $\tau$  und  $\rho$ , welche die Orientierung einer  $\alpha$ -Helix in einer Membran vollständig beschreiben. Die Schräglage der Helix, welche symbolisch durch einen Zylinder dargestellt ist, wird durch Drehung um die  $y$ -Achse um den Winkel  $\tau$  definiert. Die Phase der Helix ist durch eine Drehung um  $z_H$  um den azimuthalen Drehwinkel  $\rho$  gegeben. Für weitere Erklärungen siehe Text. (B) Projektion der Helix (*helical wheel projection*) der vermuteten Transmembranhelix mit der Sequenz: PGLILIFVIALIIFGP. Für Valin wurde ein Rotationswinkel von  $\rho = 215^\circ$  gefunden.

Die Definition von  $\tau$  und  $\rho$  soll in Abb. 56A anhand einer um  $40^\circ$  geneigten und  $145^\circ$  gedrehten  $\alpha$ -Helix veranschaulicht werden. Es sind zwei rechtshändige Koordinatensysteme gezeigt, das Laborkoordinatensystem  $(x_L, y_L, z_L)$  und das Helix-Koordinatensystem  $(x_H, y_H, z_H)$ . Die  $y$ -Achsen beider Koordinatensysteme fallen zusammen ( $y_L = y_H$ ) und zeigen in die Papierebene hinein. Die Richtung der  $z_L$ -Achse ist durch das Magnetfeld  $B_0$  gegeben, während die Richtung der  $z_H$ -Achse vom N- Terminus zum C-Terminus der Helix zeigt.

Der Kippwinkel  $\tau$  der Helix ist gegeben durch eine Rechts-Drehung von der Membrannormalen ( $N \parallel B_0 \parallel z_L$ ,  $\tau = 0$  für  $z_H = z_L$ ) um die  $y_H (= y_L)$ -Achse. Der azimuthale Rotationswinkel  $\rho$ , der die Phase der Helix beschreibt, ist gegeben durch eine Rechts-Drehung um  $z_H$ , wobei der Bezugspunkt (die Bezugsseite der Helix) durch die Durchstoßpunkte des Richtungsvektors der  $x_H$ -Achse durch den Helixzylinder gegeben ist. Dies entspricht der unteren Schnittlinie der Helix mit der in Abb. 56A hellblau dargestellten  $x_H-z_H$ -Ebene mit der Helix. Auf dieser Seite der Helix liegen die Aminosäuren mit den am meisten gekippten N-H-Bindungen bezüglich  $B_0$ , einer weiteren Definition für  $\rho = 0$ , die in der Literatur zu finden ist [96]. Der Rotationswinkel einer bestimmten Aminosäure wird durch Rechts-Drehung aus der Nulllage in die Lage der Aminosäure gefunden. Der Rotationswinkel der Helix wird hier als der Rotationswinkel des  $C_\alpha$ -Atoms der ersten Aminosäure der Helix definiert.

Für das  $C_\alpha$ -Atom von Val15 wurde durch Vergleich mit simulierten NMR-Spektren ein Rotationswinkel von  $\rho = 215^\circ \pm 20^\circ$  gefunden (siehe Abb. 56B).

Die HSQC-H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O-Austauschexperimente lassen vermuten, dass die Sequenz der Transmembranhelix von TatA<sub>2-45</sub> in SDS-Mizellen mit Pro8 (siehe Abschn. 4.4.1.3. und 5.3.) beginnt. Unter der Annahme von Pro8 als erste Aminosäure der Helix, ergibt sich so für die gesamte Helix (bzw. für C<sub>α8</sub>) eine nominelle Phase von  $\rho = 235^\circ \pm 20^\circ$ .

#### 4.5.2.6. Fehlerbetrachtung

Auf ein systematisches Fitten der PISEMA- und SAMMY-Daten mittels Analyse der minimalen Abweichung (RMSD-Analyse) wurde hier verzichtet. Diese Methode zur Quantifizierung des Fehlers ist auf Fehler statistischer Natur ausgerichtet. Diese haben jedoch, zumindest im Fall von TatA<sub>2-45</sub>, einen geringeren Einfluss auf die experimentellen Daten als die systematischen Fehler.

Als statistische Fehler lassen sich Signal-zu-Rausch-Verhältnis, Linienbreite, Homogenität der Proben und Probenbedingungen nennen, wohingegen sich systematische Fehler auf die Kenntnis der Helix-Parameter (Diederwinkel des Proteinrückgrats, Bindungslängen, Tensorelementgrößen und -orientierung, u. s. w.) und die Dynamik des Systems beziehen.

So sind zwar die genauen Diederwinkel für eine ideale Helix bekannt, sie können jedoch in der realen Helix abweichen. Variationen der Diederwinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  des Proteinrückgrats von  $\pm 10^\circ$  führen zu Abweichungen der <sup>15</sup>N chemischen Verschiebungen von  $\pm 15$  ppm und zu Abweichungen in der <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N Dipol-Aufspaltung von etwa  $\pm 1$  kHz [90]. Ebenso stellt die Annahme eines einzigen Satzes an Tensorhauptwerten für alle Aminosäure-Arten nur eine Näherung dar (insbesondere Glycin weicht stark ab). Es wurden Unterschiede der Hauptachsen des CSA-Tensors von Aminosäure zu Aminosäure von  $\pm 20$  ppm beobachtet [127,128]. Diese Unterschiede führen zu Abweichungen von  $\pm 15$  ppm der berechneten Resonanzen. Eine Abweichung der N-H- Bindungslängen von  $\pm 0,02$  Å führt zu einer Abweichung von nur  $\pm 0,6$  kHz [90].

Im Falle des PISEMA-Experiments ist außerdem noch zu bedenken, dass die theoretische Skalierung des Spektrums in der Dimension der dipolaren Kopplung von  $1/\sqrt{2/3}$  [107] nur dann korrekt ist, wenn die Messung ideal optimiert wurde. Es hat sich jedoch im Falle des PISEMAs von TatA<sub>22-70</sub> gezeigt, dass selbst bei einem Verzicht auf die Durchführung dieser Skalierung der gleiche Kippwinkel von  $75^\circ$  erhalten wird. Das Spektrum erscheint dann gestaucht und man erhält ein kleineres Ringmuster, welches jedoch durch einen kleineren Ordnungsparameter angepasst werden kann und dann zu dem gleichen Ergebnis führt.

---

Eine weitere Fehlerquelle, die eine Streuung um das ideale Ringmuster hervorruft, sind lokale Verzerrungen der Helix-Geometrie, wie sie typischerweise durch Glycin und Prolin hervorgerufen werden. Während Abweichungen der Helix-Geometrie von der Idealität, sowie eine Abweichung der Orientierung der zwei Wechselwirkungs-Tensoren zueinander die Form des Ringmusters sehr stark verzerren können, bleibt das Zentrum des PISA-*wheels* nahezu unverändert [89]. Da das Zentrum des PISA-*wheels* den Neigungswinkel  $\tau$  bestimmt, wirken sich somit Abweichungen von der idealen Helix kaum auf diesen Winkel aus. Daher kann der Winkel  $\tau$  mit relativ hoher Sicherheit angegeben werden, wohingegen der Rotationswinkel  $\rho$  nur weniger genau bestimmt werden kann.

Insgesamt wird der Fehler von  $\tau$  im Fall der Transmembranhelix von TatA<sub>2-45</sub> auf  $\pm 3^\circ$  geschätzt. Für die Helix von TatA<sub>22-70</sub> wurde wegen des schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis ein größerer Fehler von  $\pm 5^\circ$  geschätzt.

Im dem SAMMY-Spektrum von TatA<sub>2-45</sub> weicht Val15 etwas stärker von der Linie des simulierten idealen PISA-*wheels* ab als die restlichen Signale (siehe, Abb. 52B). Es ist davon auszugehen, dass die Helix an dieser Stelle lokal verzerrt ist. Daher ist es schwierig die entsprechende Position auf dem Ring zu definieren und es wurde die Verlängerung der Mittelpunktlinie von dem Val15-Signal auf das Ringmuster verwendet. Der Fehler für  $\rho$  wird auf  $\pm 20^\circ$  geschätzt.

## 5. Diskussion

### 5.1. Expression, $^{15}\text{N}$ -Markierung und Aufreinigung der Proteine

Zur Strukturanalyse des Membranproteins TatA<sub>d</sub>, der Hauptkomponente des Tat-Translokationssystems in *B. subtilis*, wurden neben dem gesamten Protein noch die verkürzten Konstrukte TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub>  $^{15}\text{N}$ -markiert und unmarkiert rekombinant in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt.

Alle drei Proteine ließen sich sowohl markiert als auch unmarkiert in hohen Ausbeuten überexprimieren, was darauf hindeutet, dass die rekombinanten Proteine nicht toxisch für das Bakterium sind. Die Zellen erreichten auch in M9-Minimalmedium, in welchem das Bakterium alle Aminosäuren aus  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  biosynthetisch herstellen muss, hohe Optische Dichten.

TatA<sub>2-45</sub> wurde zusätzlich selektiv mit den Aminosäuren  $^{15}\text{N}$ -Valin,  $^{15}\text{N}$ -Isoleucin,  $^{15}\text{N}$ -Leucin,  $^{15}\text{N}$ -Alanin und  $^{15}\text{N}$ -Phenylalanin markiert. Für die Markierung mit  $^{15}\text{N}$ -Alanin, das zu *scrambling*, das heißt zur biosynthetischen Umwandlung in andere Aminosäuren und damit zur Verteilung der Markierung über das Protein neigt, stellte sich die Zugabe von  $\beta$ -Alanin, welches das hauptverantwortliche Enzym für diesen Mechanismus (Ala-Val-Transaminase)[102,103] inhibiert, als nützlich heraus. Wie mit Hilfe der HSQC-NMR-Spektroskopie gezeigt werden konnte, verliefen alle Markierungen erfolgreich und es trat kein *scrambling* auf.

Da die Proteine als Fusion mit einem His-Tag exprimiert wurden, konnten sie im ersten Reinigungsschritt über Ni-Affinitätschromatographie isoliert werden. Eine weitere Reinigung erfolgte bei TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>22-70</sub> über eine Gelfiltration. Bei TatA<sub>2-45</sub> konnte auf eine Gelfiltration verzichtet werden, da das Protein bereits nach der Affinitätschromatographie sehr rein vorlag. Für die Aufreinigung von TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub>, welche das Transmembransegment enthalten, erwies sich die Verwendung des anionischen Detergenz N-Lauroylsarkosin (NLS) als sehr hilfreich. Dieses Detergenz wurde den Reinigungspuffern zugesetzt, war mit den verwendeten chromatographischen Methoden kompatibel und konnte sowohl die Bindung der Proteine an die Ni-NTA-Säule verbessern, als auch die zur Aggregation neigenden Proteine in Lösung stabilisieren. NLS eignete sich außerdem für die Rekonstituierung von TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub> in Lipidvesikel für spätere Strukturuntersuchungen. Während TatA<sub>d</sub> ohne Detergenz über einen gewissen Zeitraum in wässriger Lösung stabil ist,

fällt das um den C-Terminus verkürzte Konstrukt TatA<sub>2-45</sub> nach Entfernung des Detergenz sofort aus. Dies deutet darauf hin, dass der 5 positive und 7 negative Ladungen besitzende C-Terminus (Rest 45-70) das gesamte TatA<sub>d</sub> in wässriger Lösung stabilisiert und stützt die Annahme von Pop et al. (2003), dass TatA<sub>d</sub> Mizellenartige Strukturen mit der N-terminalen hydrophoben Helix nach innen und dem geladenen hydrophilen C-Terminus nach außen bildet [99].

Der N-terminale His-Tag wurde nach der Isolierung der Proteine mittels CNBr-Spaltung entfernt. Hierfür musste das Detergenz mittels Dialyse entfernt werden. Für die Abspaltungsreaktion mit CNBr stellte sich 50% TFA als Lösungsmittel als die mildeste Methode heraus. Alle drei Proteinkonstrukte konnten nach der Abspaltung wieder mit H<sub>2</sub>O bidest. (TatA<sub>22-70</sub>) bzw. mit Hilfe von Detergenz (TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub>) in Lösung gebracht werden. Alle Proteinkonstrukte konnten in mg Ausbeuten (15-25 mg/l) und hoher Reinheit isoliert werden, was entscheidend für die weiteren biophysikalischen Strukturuntersuchungen war.

## 5.2. CD- und OCD-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur und Topologie von TatA<sub>d</sub>, TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub> mittels CD- und OCD-Spektroskopie wurden die drei TatA-Konstrukte erfolgreich in verschiedene membranimitierende Umgebungen rekonstituiert.

Die CD-spektroskopischen Messungen an TatA<sub>22-70</sub>, welches aus dem mittleren amphiphilen Segment und dem C-Terminus von TatA<sub>d</sub> besteht, zeigten, dass dieses Fragment seine  $\alpha$ -helikale Struktur nur in einer negativ geladenen Umgebung annimmt. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit Studien von Porcelli et al. [35], in denen ein äquivalentes TatA-Fragment aus *E. coli* CD-spektroskopisch untersucht wurde. Dieses TatA-Fragment (dem ebenso wie TatA<sub>22-70</sub> die N-terminale Transmembranhelix fehlt) zeigte nur in Liposomen aus polaren Lipiden der *E. coli* Membran eine  $\alpha$ -helikale Faltung, wenngleich in geringerem Ausmaß als erwartet. In Puffer war das *E. coli*-TatA-Fragment, ebenso wie TatA<sub>22-70</sub>, unstrukturiert. Hieraus wurde von Porcelli vorgeschlagen, dass das Protein das N-terminale transmembrane Segment benötigt, um sich korrekt zu falten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -helikale Faltung einzig von der negativen Ladung der Umgebung abhängig ist. Dieses Ergebnis ist außerdem konsistent mit einem Befund von Mikhaleva et al. [129], dass negativ geladene Phospholipide für die Effektivität der Tat-Translokase von essentieller Bedeutung sind.

Die CD-Spektren von TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub> zeigen ebenfalls einen deutlichen  $\alpha$ -helikalen Strukturanteil. Die Spektren der in dieser Arbeit hergestellten TatA-Konstrukte wurden mit anderen im Arbeitskreis hergestellten TatA-Fragmenten verglichen. Ein berechnetes Differenzspektrum, indem das CD-Signal von TatA<sub>22-45</sub> von dem von TatA<sub>22-70</sub> abgezogen wurde, also ein Spektrum, das charakteristisch für den C-terminalen Bereich von TatA<sub>d</sub> (Rest 45-70) sein sollte, zeigt eine Linienform, die typisch für ein ungefaltetes Polypeptid ist. Die Messungen bestätigen damit das sequenzbasiert vorhergesagte Topologiemodell für TatA-Proteine mit einer N-terminalen  $\alpha$ -Helix, einem amphiphilen  $\alpha$ -helikal gefalteten Mittelsegment und einem unstrukturierten C-Terminus.

Orientierter Circular dichroismus (OCD) ist eine geeignete Methode für die Untersuchung der Topologie und Ausrichtung von  $\alpha$ -helikalen Membranproteinen in einer für sie physiologisch relevanten Umgebung, einer Modellmembran.

TatA<sub>d</sub> und die TatA-Fragmente TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub> wurden für die OCD-spektroskopischen Messungen in negativ geladenen Phospholipiddoppelschichten (DMPC:DMPG = 30:70) orientiert. Die Spektren von TatA<sub>d</sub> und TatA<sub>2-45</sub> zeigen eine Überlagerung der charakteristischen Linienformen von transmembranen (*I-state*) und von parallel zur Membranoberfläche lokalisierten (*S-state*)  $\alpha$ -Helices, was ebenfalls im Einklang mit dem vorhergesagten Strukturmodell von TatA ist. Lediglich für das wasserlösliche Konstrukt TatA<sub>22-70</sub> konnte keine der für  $\alpha$ -Helices in bestimmter Orientierung charakteristischen Linienformen gefunden werden. Möglicherweise ist die Probe teilweise  $\beta$ -aggregiert, wobei die Linienform der  $\beta$ -Aggregation den  $\alpha$ -helikalen Anteil in der Probe dominiert.

### 5.3. Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie

Das <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC-Experiment stellt eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur schnellen Charakterisierung der Qualität <sup>15</sup>N-markierter Proteine dar. Das HSQC-Spektrum eines Proteins verhält sich wie sein „Fingerabdruck“ und zeigt einerseits, anhand der spektralen Verteilung (Dispersion) und Form der Signale, ob ein Protein wohlgefaltet ist und in einer bestimmten Konformation vorliegt. Andererseits kann man durch Abzählen der Signale die Identität des Proteins bzw. bei selektiv markierten Proben den Erfolg der Markierung erkennen, da jede N-H-Gruppe genau eine Resonanzlinie erzeugt.

Das <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum des uniform markierten <sup>15</sup>N-TatA<sub>2-45</sub> ist charakteristisch für ein gut gefaltetes Protein in einer wohldefinierten Konformation. Die HSQC-Spektren der

selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierten TatA<sub>2-45</sub>-Proben bestätigten den Erfolg der Markierung, da sie die richtige Anzahl an Signalen enthalten. Durch Vergleich mit dem Spektrum der uniform markierten Probe ließen sich in letzterem bereits ein Teil der Signale zu bestimmten Aminosäuretypen zuordnen. Dies ist nützlich im Zusammenhang mit einem ebenfalls durchgeführten H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O-Austauschexperiment, in dessen HSQC-Spektrum nur noch die durch die SDS-Mizelle und durch starke Wasserstoffbrückenbindungen vor einem Austausch mit D<sub>2</sub>O geschützten Protonen der Transmembranhelix verbleiben.

Das HSQC-Spektrum von uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertem TatA<sub>2-45</sub> in 90% D<sub>2</sub>O (Abb. 46) zeigt Signale von einem Valin, 2 Phenylalaninen, 4 Isoleucinen, einem Alanin, 4 Leucinen und zwei anderen, nicht identifizierten Aminosäuren. Vergleicht man dies mit der Sequenz von TatA<sub>2-45</sub> (siehe Abb. 57), so ist erkennbar, dass die Transmembranhelix aus dem Sequenzabschnitt (P)GLILIFVIALIIFG(P) bestehen könnte. Dieser Abschnitt weist genau die gleiche Aminosäurezusammensetzung auf, mit Ausnahme von Leucin, von dem in der Sequenz 3, im HSQC-Spektrum jedoch 4 vorhanden sind. Über Prolin kann keine Aussage getroffen werden, da es, wie schon erwähnt, in einem  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum nicht sichtbar ist. Das zusätzliche vierte Leucin-Signal könnte aus der amphiphilen Helix von TatA<sub>2-45</sub> stammen und könnte neben einem Schutz durch Wasserstoffbrückenbindungen einen Schutz durch die Mizelle erfahren, in die es eingetaucht sein könnte.



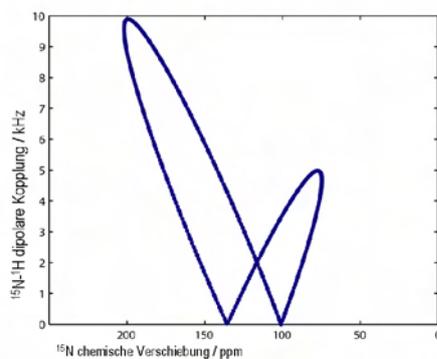
**Abb. 57:** Primärsequenz von TatA<sub>2-45</sub>, der für eine Transmembranhelix favorisierte Sequenzabschnitt ist grau unterlegt.

## 5.4. Festkörper-NMR-Spektroskopie

Zur detaillierten Untersuchung der Struktur von TatA<sub>d</sub> wurden die TatA-Konstrukte TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub> mittels ein- und zweidimensionaler Festkörper-NMR-Spektroskopie vermessen. Für diese Messungen wurde TatA<sub>22-70</sub> in Phospholipiddoppelschichten auf Glasplättchen mechanisch orientiert, während TatA<sub>2-45</sub> in Phospholipid-Bizellen magnetisch orientiert wurde. Die eindimensionalen  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren beider Proteine zeigen einen hohen Grad an Proteinorientierung, womit die Orientierungsstrategie für beide Proteine erfolgreich war.

Das zweidimensionale PISEMA-Experiment von  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>22-70</sub> zeigt Intensität in einem Bereich, der für eine oberflächengebundene  $\alpha$ -Helix charakteristisch ist. Dies steht im Einklang mit der vorhergesagten Topologie von TatA und mit den Ergebnissen der CD-

Messungen, in denen TatA<sub>22-70</sub> eine helikale Struktur besitzt. Zu diesen Befunden stehen nur die OCD-Messungen von TatA<sub>22-70</sub> im Widerspruch, in denen keine  $\alpha$ -helikale Linienform erhalten wurde, was in diesen OCD-Proben auf eine  $\beta$ -Aggregation des Fragments hindeutet. Die OCD-Spektroskopie ist ein relativ neues Gebiet, welches zuverlässige Informationen über die Orientierung  $\alpha$ -helikaler Segmente geben kann, jedoch für andere Strukturelemente noch wenig ausgereift ist. Möglicherweise lag TatA<sub>22-70</sub> in den OCD-Proben in mehreren Konformationen vor und das Spektrum wurde durch einen kleinen  $\beta$ -aggregierten Anteil, welcher ein intensiveres OCD-Signal als die  $\alpha$ -helikale Konformation verursachte, dominiert. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und die Auflösung des PISEMA-Spektrums von TatA<sub>22-70</sub> ist nicht optimal, aber für eine planare Helix in einer mechanisch orientierten Lipidprobe, verglichen mit den entsprechenden Spektren aus der Literatur [130,131], relativ gut. Das Spektrum steht in gutem Einklang mit der Simulation einer idealen  $\alpha$ -Helix mit einem Kippwinkel von  $\tau = 75^\circ$  von der Membrannormalen und einem Ordnungsparameter von  $S = 1$ . Zum Vergleich ist in Abb. 58 die Simulation eines parallel zur Membranoberfläche liegenden  $\beta$ -Faltblatts gezeigt. Ein Muster dieser Form und spektralen Position wurde in dem PISEMA-Spektrum von TatA<sub>22-70</sub> (Abb. 49) nicht beobachtet.



**Abb. 58:**  $\beta$ -Faltblatt,  $\tau = 90^\circ$ ,  $\Phi = -140^\circ$ ,  $\Psi = 135^\circ$  [132], .

Das zweidimensionale SAMMY-Experiment (SAMMY ist eine verbesserte Version von PISEMA, enthält jedoch die gleichen Informationen) von  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>2-45</sub> in Bizellen zeigt ein PISA-wheel mit sehr guter Auflösung und beweist aufgrund seiner Position im Spektrum und aufgrund der Zuordnung des sich nahe am N-Terminus befindenden Valin15 eindeutig die Existenz der vorhergesagten N-terminalen Transmembranhelix. Das PISA-wheel zeigt eine kurze membrandurchspannende  $\alpha$ -Helix aus 14-16 Aminosäuren. Dieser Befund steht in Einklang mit den H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O-HSQC-Austauschexperimenten von TatA<sub>2-45</sub> in SDS-Mizellen, in

denen ebenfalls eine Sequenz aus 14-16 Aminosäuren gefunden wurde (abhängig davon, ob das in diesen NMR-Experimenten unsichtbare Prolin mitgezählt wurde oder nicht). Der Vergleich des PISA-*wheels* mit simulierten NMR-Spektren zeigt, dass TatA<sub>2-45</sub> um einen Kippwinkel von 17° in den Dimyristoyl-Lipiddoppelschichten der Bizellen geneigt ist. Membranspannende Helices reagieren auf die Dicke der Lipiddoppelschichten, indem sie ihren Kippwinkel anpassen (*hydrophobic mismatch*) [133]. Man kann also mit Hilfe des Kippwinkels einer Transmembranhelix in Lipiddoppelschichten bestimmter Dicke auf die Helixlänge bzw. auf die Länge des sich im hydrophoben inneren Bereich der Membran befindlichen Abschnitts der Helix Rückschlüsse ziehen. Die Ergebnisse für TatA<sub>2-45</sub> sind in guter Übereinstimmung mit anderen Ergebnissen aus der Literatur. So wurde beispielsweise für die erste 15-16 Aminosäuren lange Transmembranhelix des Proteins MerFt ein Kippwinkel von 18° in DMPC-Bizellen gefunden [97]. Studien von Bowie (1997) zeigten, dass Transmembranhelices in der Regel aus 14-36 Aminosäuren, und im Durchschnitt aus 24,6 Aminosäureresten, bestehen [134]. Die Länge der Transmembranhelix von TatA<sub>2-45</sub> erscheint sehr kurz, wenn man jedoch einen C<sub>α</sub>-zu-C<sub>α</sub>-Abstand zweier Aminosäuren in der Helix von 1,5 Å annimmt, so passt eine 16 Reste lange Helix ( $16 \cdot 1,5 \text{ \AA} = 24 \text{ \AA}$ ), die um 17° von der Membrannormalen geneigt ist, genau in den 23 Å dicken hydrophoben Bereich einer C<sub>14</sub>-Lipidmembran [133,135] ( $24 \text{ \AA} \cdot \cos(17^\circ) = 22,95 \text{ \AA}$ ).

Das simulierte Ring-Muster der idealen um 17° geneigten α-Helix passt sehr gut auf das PISA-*wheel* des experimentellen SAMMY-Spektrums (siehe Abb. 55). Dies zeigt, dass die Transmembranhelix von TatA<sub>2-45</sub> nahezu ideal ist. Die geringe Dielektrizität der hydrophoben Umgebung im Inneren der Lipidmembran führt zu verstärkten elektrostatischen Wechselwirkungen und zur Verkürzung der Wasserstoffbrückenbindungen, was wiederum dazu führt, dass membrandurchspannende Helices meist nahezu ideale Regelmäßigkeit aufweisen [136]. Einzelne Resonanzlinien des experimentellen NMR-Spektrums weichen dennoch leicht von den berechneten Werten der Simulation ab. Diese Abweichungen können durch lokale Abweichungen der Diederwinkel und Orientierungen der Peptidebenen in der Helix, sowie durch Dispersion der CSA- und Dipol-Dipol-Kopplungs-Tensorwerte je nach Aminosäuretyp zustande kommen [89], könnten jedoch auch ein Hinweis auf einen leichten Knick in der Helix sein.

Das SAMMY-NMR-Spektrum von TatA<sub>2-45</sub> war in hohem Maße reproduzierbar, und es trat nur wenig Intensität um die isotrope Position bei 120 ppm und 0 Hz auf. Dies und die Tatsache, dass jede N-H-Gruppe im Protein genau ein einziges Signal bei einer definierten chemischen Verschiebung und dipolaren Kopplung erzeugte, belegt, dass das gesamte

Proteinkonstrukt eine wohl definierte und stabile Struktur besitzt und jedes TatA<sub>2-45</sub>-Molekül identisch in der Phospholipidumgebung und relativ zum Magnetfeld orientiert ist.

Es wird angenommen, dass TatA die Proteinkanal bildende Einheit des Tat-Translokationssystems darstellt. Sowohl für TatA aus *E. coli* als auch für TatA<sub>d</sub> aus *B. subtilis* wurde in zahlreichen Studien eine Bildung von Homooligomeren beobachtet [35,43,44]. Für beide Organismen wurden membraneingebettete Multi-TatA-Komplexe mit variablem Außendurchmesser von 8,5-13 nm für *E. coli*-TatA [43] bzw. einem durchschnittlichen Außendurchmesser von 10 nm für TatA<sub>d</sub> aus *B. subtilis* [44] mittels Elektronenmikroskopie beobachtet. Golke et al. berechnete, dass die Protein-Komplexe einer Zusammensetzung aus 12-35 TatA-Einheiten entsprechen, deren Transmembranhelices in einem Ring angeordnet sind [43].

Die Bildung eines solchen Porenkomplexes aus TatA<sub>2-45</sub>-Molekülen in Bizellen ist nur dann mit den experimentell erhaltenen Daten konsistent, wenn alle Proteinmoleküle in der Pore symmetrisch angeordnet sind und den gleichen Neigungswinkel in der Membran besitzen.

Eine kleine Winkelverteilung der Moleküle (*mosaik spread*) kann jedoch auch durch die „Wobbel“-Bewegung der Bizellen herausgemittelt werden und damit im Spektrum nicht sichtbar sein.

Des Weiteren wird ein gut aufgelöstes Signalmuster mit schmalen Linien wie in dem SAMMY-Spektrum von TatA<sub>2-45</sub>, in senkrecht zum Magnetfeld orientierten Bizellen nur dann erhalten, wenn die Proteinmoleküle oder Oligomere schnelle Rotationsbewegungen (*rotational diffusion*) um die Membrannormale mit einer Rotationsdiffusionskonstante von  $D_{\text{rot}} > 10^5 \text{ s}^{-1}$  ausführen [137]. Dass dies der Fall sein kann, wurde für Proteine mit bis zu sieben Transmembranhelices gezeigt [94]. Für einen Komplex aus 12-35 Protomeren, wie die TatA<sub>2-45</sub>-Pore, wurden derart schnelle Rotationsbewegungen bisher noch nicht experimentell bestätigt. Eine Gleichung zur Abschätzung der Rotationsdiffusion einer Transmembranhelix in einer Lipidmembran nach Saffman und Delbrück [118] zeigt jedoch dass eine genügend schnelle Rotationsdiffusion theoretisch möglich ist (siehe Abschn. 3.3.10.).

Ein möglicher Grund, weshalb sich eventuell keine Pore aus TatA<sub>2-45</sub>-Molekülen gebildet haben könnte, wäre das Fehlen der 25 C-terminalen Aminosäuren, welche möglicherweise wichtig für diesen Prozess sind. Allerdings zeigten Studien von Yen (2002), dass dieser C-terminale Bereich des Proteins nicht essentiell für die Tat-abhängige Proteintranslokation ist [138,34]. Da TatA-Komplexe selbst in C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>-Detergenzmizellen isoliert werden konnten, wird das Fehlen bestimmter, in einer natürlichen bakteriellen Membran vorhandenen Komponenten als Grund für eine fehlende Oligomerisierung von TatA<sub>2-45</sub> als

unwahrscheinlich betrachtet. Darüber hinaus wurde von Westermann (2006) [44] gezeigt, dass weder TatC<sub>d</sub> noch das TatA<sub>d</sub>-Substrat PhoD die Porenbildung von TatA<sub>d</sub> beeinflussen.

Das SAMMY-Spektrum von TatA<sub>2-45</sub> gibt keinen Hinweis auf eine Änderung der Topologie der amphiphilen Helix von transmembran zu membranoberflächen-lokalisiert, wie sie von Gouffi et al. (2004) für *E. coli*-TatA im Zusammenhang mit dem Proteintransport vorgeschlagen wurde [37]. Zumindest in Abwesenheit des Tat-Substrats PhoD konnte kein Eintauchen der amphiphilen Helix beobachtet werden.

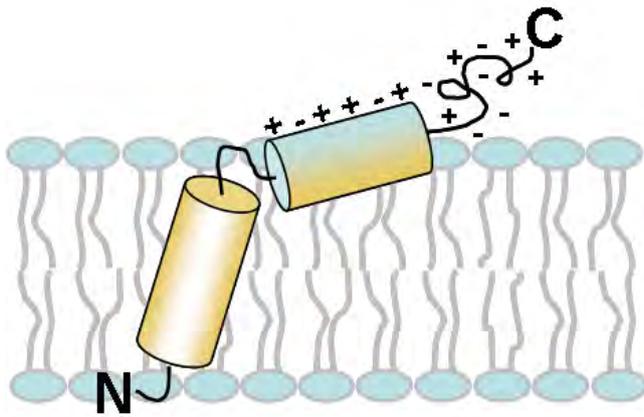
Trotz der relativ geringen Auflösung des 90°-(*in-plane*) Bereichs des Spektrums (120-135 ppm), liefert auch dieser Bereich Informationen über die Proteintopologie von TatA<sub>2-45</sub> und zeigt, wenngleich kein zweites Ringmuster einer zweiten Helix erkennbar ist, definierte und reproduzierbare Resonanzen, die charakteristisch sind für N-H-Bindungen, welche parallel zur Membranoberfläche orientiert sind.

Das Signal des <sup>15</sup>N-Valins der selektiv markierten Probe überlappt nicht perfekt mit dem entsprechenden Signal im PISA-*wheel* des Spektrums der uniform markierten Probe, der Fehler ist jedoch geringer als die Linienbreite (3,5 ppm, 225 Hz). Leichte Abweichungen in der chemischen Verschiebung können aufgrund von leicht unterschiedlichen Probenbedingungen auftreten. Dennoch konnte die Zuordnung dieses Signals eindeutig vorgenommen werden und erlaubte damit die Berechnung des Rotationswinkels der Helix zu  $\rho_{\text{Val15}} = 215^\circ$ , da die Resonanzlinien eines PISA-*wheels* eine direkte Projektion der Helix (*Helical Wheel Projection*) darstellen.

## 5.5. Vergleich der spektroskopischen Ergebnisse und Ausblick

Aus den verschiedenen CD-, OCD- und NMR-spektroskopischen Ergebnissen kann nun ein verfeinertes Strukturmodell von TatA<sub>d</sub> zusammengesetzt werden. Dieses Modell gibt den sequenzbasierten Vorhersagen für TatA-Proteine erstmals eine experimentell bestätigte Grundlage.

Abb. 56 zeigt das neue Strukturmodell von TatA<sub>d</sub> aus *B. subtilis*: Eine N-terminale kurze (ca. 24 Å), 14-16-Aminosäuren enthaltende Transmembranhelix mit der Sequenz (P)GLILIFVIALIIFG(P), die um  $17^\circ \pm 3^\circ$  in der DMPC/DMPG-Membran geneigt ist wird gefolgt von einer amphiphilen um ca.  $75^\circ \pm 5^\circ$  geneigten  $\alpha$ -Helix, und es folgt schließlich ein stark geladener unstrukturierter C-Terminus. Die Transmembranhelix besitzt an der Stelle der Aminosäure Valin15 einen Drehwinkel von  $215^\circ \pm 20^\circ$ .



**Abb. 59:** Verfeinertes Strukturmodell von TatA<sub>d</sub> mit einer N-terminalen um 17° von der Membrannormalen geneigten membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helix, einer um 75° von der Membrannormalen geneigten amphiphilen  $\alpha$ -Helix und einem unstrukturierten C-Terminus.

Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie zeigten, dass alle TatA-Konstrukte, auch TatA<sub>22-70</sub>,  $\alpha$ -helikal gefaltet sind, und dass nur die letzten 25 Reste des C-Terminus unstrukturiert vorliegen. Die OCD-Messungen in Lipiddoppelschichten fügten Informationen über die qualitative Ausrichtung dieser helikalen Segmente hinzu und ergaben, dass TatA<sub>d</sub> eine transmembrane sowie eine oberflächliche  $\alpha$ -Helix besitzt. Die Länge der Transmembranhelix und ihre Sequenz in SDS-Mizellen konnte durch HSQC-NMR-Experimente an uniform und verschiedenen selektiv markierten TatA<sub>2-45</sub>-Proben mit unterschiedlichem D<sub>2</sub>O-Gehalt bestimmt werden. Diese Länge korreliert mit der mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie an TatA<sub>2-45</sub> in Bizellen abgeschätzten Helixlänge. Auch der gefundene Kippwinkel von 17° in DMPC-Lipiddoppelschichten steht mit diesem Befund in Einklang. Die zentrale Helix konnte durch ein Festkörper-PISEMA-Experiment an TatA<sub>22-70</sub> sichtbar gemacht werden und der gemessene Winkel von 75° korreliert mit ihrem amphiphilen Charakter.

Die Ergebnisse bestätigen, dass TatA tatsächlich die strukturellen Voraussetzungen mit sich bringt, als Proteinkanal-bildende Komponente der Tat-Translokase zu fungieren.

Wenngleich die Strukturaufklärung des Proteinkanal bildenden Membranproteins TatA<sub>d</sub> erheblich vorangetrieben wurde, bleiben noch viele Fragen offen und weitere viel versprechende Experimente können auf der Grundlage dieser Arbeit durchgeführt werden, um die Struktur auf atomarem Niveau zu verfeinern. Die Wesentlichen seien im Folgenden kurz genannt:

- SAMMY der selektiv markierten TatA<sub>2-45</sub>-Proben
- SAMMY-H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O-Austauschexperiment von TatA<sub>2-45</sub>

- 
- Flippen der TatA<sub>2-45</sub>-Bizellen-Probe durch Zugabe von Lanthanoid-Ionen
  - HSQC von TatA<sub>22-70</sub> in SDS-Mizellen unter gleichen Bedingungen wie für TatA<sub>2-45</sub>
  - HSQC von TatA<sub>2-45</sub> in 50% D<sub>2</sub>O, um die amphiphile Helix zu identifizieren
  - SAMMY von TatA<sub>d</sub> in Bizellen

## 6. Zusammenfassung

Das Membranprotein TatA<sub>d</sub> aus *B. subtilis* stellt die Hauptkomponente der Tat-Translokase dar, ein Transportsystem, welches Proteine in ihrem gefalteten Zustand durch Membranen translozieren kann. Der Mechanismus der Tat-abhängigen Translokation ist unbekannt, und für die Struktur seiner Komponenten existierten bisher lediglich sequenzbasierte Vorhersagen.

Ziel dieser Arbeit war es, sowohl die Sekundärstruktur als auch die Topologie von TatA<sub>d</sub> in seiner physiologisch relevanten Umgebung, einer Lipidmembran, spektroskopisch zu untersuchen. Dabei wurde neben CD- und OCD-spektroskopischen Messungen der Schwerpunkt auf die Festkörper-NMR-Spektroskopie gesetzt.

Zu diesem Zweck wurden verkürzte Konstrukte des Proteins (TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub>), sowie das gesamte Protein TatA<sub>d</sub> rekombinant in *E. coli* hergestellt und aufgereinigt. Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden die Proteine einheitlich mit dem Isotop <sup>15</sup>N markiert. Von dem Konstrukt TatA<sub>2-45</sub> wurden außerdem fünf verschiedene Aminosäuren-selektive <sup>15</sup>N-Markierungen hergestellt, wobei durch spezielle Zusätze im Nährmedium ein *scrambling* erfolgreich unterdrückt werden konnte. Alle drei Proteinkonstrukte wurden in guter Ausbeute und mit hoher Reinheit erhalten. Es wurde für die unterschiedlich langen und unterschiedlich hydrophoben Proteinkonstrukte jeweils ein Protokoll erarbeitet, mit welchem sie in verschiedene Modellmembranen rekonstituiert und orientiert werden konnten.

CD-spektroskopische Messungen in Lipidvesikeln zeigten  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur-Anteile für alle drei Proteinkonstrukte und eine unstrukturierte C-terminale Region. Damit konnte bereits ein Teil der Strukturvorhersagen für TatA bestätigt werden. Es konnte anhand von CD-Messungen an dem extramembranen Konstrukt TatA<sub>22-70</sub> gezeigt werden, dass die amphiphile Helix sich nur in negativ geladener Umgebung ausbildet. Dies zeigte, dass ein Anteil anionischer Lipide für eine Modellmembran nötig ist, um die stark negativ geladene bakterielle Membran zu imitieren.

Mittels orientiertem Circular dichroismus konnte das Topologiemodell von TatA<sub>d</sub> mit einer transmembranen und einer planaren  $\alpha$ -Helix bestätigt werden. HSQC-NMR-Messungen zeigten nicht nur den Erfolg der selektiven Markierungen, sondern es konnte auch eine Aussage über die Länge und Sequenz der Transmembranhelix von TatA<sub>d</sub> in SDS-Mizellen getroffen werden.

Für eine detailliertere dreidimensionale Strukturaufklärung wurden TatA<sub>22-70</sub> und TatA<sub>2-45</sub> mittels zweidimensionaler korrelierter Festkörper-NMR-Spektroskopie (PISEMA und SAMMY) vermessen. Das PISEMA-Experiment des Fragments TatA<sub>22-70</sub> zeigt die amphiphile Helix. Es konnte durch Vergleich mit simulierten NMR-Spektren ein Kippwinkel von  $75^\circ \pm 5^\circ$  in der Membran gefunden werden. Das zweidimensionale Spektrum (SAMMY) von TatA<sub>2-45</sub> besaß eine außergewöhnlich gute Auflösung und zeigte die 14-16 Aminosäuren lange Transmembranhelix mit einem Kippwinkel von  $17 \pm 3^\circ$  und einem Rotationswinkel von Valin15 von  $215^\circ \pm 20^\circ$ .

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen erstmals die bereits 1997 vorhergesagte Topologie von TatA-Proteinen. Darüber hinaus konnte ein detaillierteres Strukturmodell für TatA<sub>d</sub> aus *B. subtilis* aufgestellt werden, in dem nicht nur die Sekundärstrukturelemente charakterisiert und quantifiziert wurden, sondern auch die exakte Ausrichtung der  $\alpha$ -Helices in der Membran bestimmt werden konnte.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse können weitere mechanistische Modelle postuliert und besser diskutiert werden.

---

## 7. Literatur

---

<sup>1</sup> J.M. van Dijk, P.G. Braun, C. Robinson, W.J. Quax, H. Antelmann, M. Hecker, J. Müller, H. Tjalsma, S. Bron, J.D.H. Jongbloed, Functional genomic analysis of the *Bacillus subtilis* Tat pathway for protein secretion, *J. Biotechnol.* 98 (2002) 243-254. Review.

<sup>2</sup> B.C. Berks, T. Palmer, F. Sargent, Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway, *Current Opinion in Microbiology* 8 (2005) 174–181.

<sup>3</sup> B.C. Berks, T. Palmer, F. Sargent, The Tat Protein Translocation Pathway and its Role in Microbial Physiology, *Adv. Microb. Physiol.* 47 (2003) 187-254.

<sup>4</sup> O. Pop, U. Martin, C. Abel, J.P. Müller, The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatA<sub>d</sub>/TatC<sub>d</sub> proteins of *Bacillus subtilis* form an autonomous Tat translocation system, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 3268–3273.

<sup>5</sup> G. Blobel, B. Dobberstein, Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma, *J. Cell Biol.* 67 (1975) 835-851.

<sup>6</sup> T.A. Rapoport, M.M. Rolls, B. Jungnickel, Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8 (1996) 499-504.

<sup>7</sup> A.E. Johnson, M.A. van Waes, The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15 (1999) 799-842.

<sup>8</sup> A.P. Pugsley, The complete general-secretory pathway in Gram-negative bacteria, *Microbiol Rev* 57, (1993) 50–108.

<sup>9</sup> E.H. Manting, A.J.M. Driessen, *Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine, *Mol. Microbiol.* 37 (2000) 226–238.

<sup>10</sup> A. Baker, C.P. Kaplan, M.R. Pool, Protein targeting and translocation; a comparative survey, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* (1996) 637-702. Review.

<sup>11</sup> S. Subramani, Hitchhiking fads en route to peroxisomes. *J. Cell Biol.* 156 (2002) 415-417. Review.

- 
- <sup>12</sup> R.M. Mould, C. Robinson, A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 12189–12193.
- <sup>13</sup> R. Voelker, A. Barkan, Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid, *EMBO J.* 14 (1995) 3905-3914.
- <sup>14</sup> M.A. Settles, A. Yonetani, A. Baron, D.R. Bush, K. Cline, R. Martienssen, Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein, *Science* 278 (1997) 1467-1470.
- <sup>15</sup> J. Weiner, P. Bilous, G. Shaw, S. Lubitz, L. Frost, G. Thomas, J.A. Cole, R.J. Turner, A Novel and Ubiquitous System for Membrane Targeting and Secretion of Cofactor-Containing Proteins, *Cell* 93 (1998) 93-101.
- <sup>16</sup> F. Sargent, E. Bogsch, M. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. Berks, T. Palmer, Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway, *EMBO J.* 17 (1998) 3640-3650.
- <sup>17</sup> E.G. Bogsch, F. Sargent, N.R. Stanley, B.C. Berks, C. Robinson, T. Palmer, An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18003-18006.
- <sup>18</sup> G.W. Hutcheon, A. Bolhuis, The archaeal twin-arginine translocation pathway, *Biochemical Society Transactions* 31 (2003) 686-689.
- <sup>19</sup> T.L. Yahr, W.T. Wickner, Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro, *EMBO J.* 20 (2001) 2472–2479.
- <sup>20</sup> J. Mori, K. Cline, A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid  $\Delta$ pH/Tat translocase, *J. Cell Biol.* 157 (2002) 205–210.
- <sup>21</sup> B.C. Berks, A common export pathway for proteins binding complex redox factors? *Mol Microbiol* 22 (1996) 393-404.
- <sup>22</sup> D. Halbig, T. Wiegert, N. Blaudeck, R. Freudl, G.A. Sprenger, The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding, *Eur. J. Biochem.* 263 (1999) 543–551.

- 
- <sup>23</sup> G. Buchanan, F. Sargent, B.C. Berks, T. Palmer,  
A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif,  
Arch. Microbiol. 177 (2001) 107–112.
- <sup>24</sup> C. Santini, B. Ize, A. Chanal, M. Müller, G. Giordano, L. Wu,  
A novel Sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*,  
EMBO J. 17 (1998) 101–112.
- <sup>25</sup> H. Mori, K. Cline,  
Post-translational protein translocation into thylakoids by the Sec and  $\Delta$ pH-dependent pathways,  
Biochim Biophys Acta 1541(2001) 80-90.
- <sup>26</sup> H. Loos, M. Völler, B. Rehr, Y.D. Stierhof, H. Sahmand, G.A. Sprenger,  
Localization of the glucose-fructose oxidoreductase in wild type and overproducing strains of *Zymomonas mobilis*,  
FEMS Microbiol Lett. 84 (1991) 211-216.
- <sup>27</sup> B. Ize, N.R. Stanley, G. Buchanan, T. Palmer,  
Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity,  
Mol Microbiol 48 (2003)1183-1193.
- <sup>28</sup> B. Ize, I. Porcelli, S. Lucchini, J.C. Hinton, B.C. Berks, T. Palmer,  
Novel phenotypes of *Escherichia coli* tat mutants revealed by global gene expression and phenotypic analysis,  
J. Biol. Chem. 279 (2004) 47543-47554.
- <sup>29</sup> S. Meloni, L. Rey, S. Sidler, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso, J.M. Palacios,  
The twin-arginine translocation (Tat) system is essential for *Rhizobium*-legume symbiosis,  
Mol Microbiol 48 (2003) 1195-1207.
- <sup>30</sup> U.A. Ochsner, A. Snyder, A.I.Vasil, M.L. Vasil,  
Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis,  
Proc Natl Acad Sci USA 99 (2002) 8312-8317.
- <sup>31</sup> N. Pradel, C. Ye, V. Livrelli, J. Xu, B. Joly, L.F. Wu,  
Contribution of the twin arginine translocation system to the virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.  
Infect. Immun. 71 (2003) 4908-4916.
- <sup>32</sup> B.C. Berks, F. Sargent, T. Palmer,  
The Tat protein export pathway,  
Mol. Microbiol. 35 (2000) 260-274.
- <sup>33</sup> F. Sargent, , B.C. Berks, T. Palmer,  
Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein targeting system,  
Arch Microbiol 178 (2002) 77–84.

- 
- <sup>34</sup> P.A. Lee, G. Buchanan, N.R. Stanley, B.C. Berks, T. Palmer, Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 5871–5879.
- <sup>35</sup> I. Porcelli, E. de Leeuw, R. Wallis, E. van den Brink-van der Laan, B. de Kruijff, B.A. Wallace, T. Palmer, B.C. Berks, Characterization and Membrane Assembly of the TatA Component of the *Escherichia coli* Twin-Arginine Protein Transport System, *Biochemistry* 41 (2002) 13690-13697.
- <sup>36</sup> K. Gouffi, C.L. Santini, L.F. Wu, Topology determination and functional analysis of the *Escherichia coli* TatC protein, *FEBS Lett.* 525 (2002) 65-70.
- <sup>37</sup> K. Gouffi, F. Gerard, C.L. Santini, L.F. Wu, Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 11608–11615.
- <sup>38</sup> A. Lee, D. Tullman-Ercek, G. Gergiou, The Bacterial Twin-Arginine Translocation Pathway, *Annu. Rev. Microbiol.* 60 (2006) 373-395.
- <sup>39</sup> E. De Leeuw, I. Porcelli, F. Sargent, T. Palmer, B.C. Berks, Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway, *FEBS Lett.* 506 (2001)143-48.
- <sup>40</sup> J. Oates, C.M. Barrett, J.P. Barnett, K.G. Byrne, A. Bolhuis, C. Robinson, The *Escherichia coli* twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex, *J. Mol. Biol.* 346 (2005) 295-305.
- <sup>41</sup> A. Bolhuis, E.G. Bogsch, C. Robinson, Subunit interactions in the twin-arginine translocase complex of *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 472 (2000) 88–92
- <sup>42</sup> F. Sargent, U. Gohlke, E. DeLeeuw, N.R. Stanley, T. Palmer, H.R. Saibil, B.C. Berks, Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 3361–3367.
- <sup>43</sup> U. Gohlke, L. Pullan, C.A. McDevitt, I. Porcelli, E. deLeeuw, T. Palmer, H.R. Saibil, B.C. Berks, The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 10482–10486

- 
- <sup>44</sup> M. Westermann, O.I. Pop, R. Gerlach, T.R. Appel, W. Schlörmann, S. Schreiber, J.P. Müller,  
The TatA<sub>d</sub> component of the *Bacillus subtilis* twin-arginine protein transport system forms homo-multimeric complexes in its cytosolic and membrane embedded localisation,  
*Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (2006) 443–451.
- <sup>45</sup> A. Bolhuis, J.E. Mathers, J.D. Thomas, C.M. Barrett, C. Robinson,  
TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*,  
*J. Biol. Chem.* 276 (2001) 20213–20219.
- <sup>46</sup> K. Cline, H. Mori,  
Thylakoid Delta pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport,  
*J. Cell Biol.* 154 (2001) 719–729.
- <sup>47</sup> M. Alami, I. Luke, S. Deitermann, G. Eisner, H.G. Koch, J. Brunner, M. Müller,  
Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*,  
*Mol. Cell.* 12 (2003) 937–946.
- <sup>48</sup> J. Mori, K. Cline,  
A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid ΔpH/Tat translocase,  
*J. Cell Biol.* 157 (2002) 205–210.
- <sup>49</sup> T.L. Yahr, W.T. Wickner,  
Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro,  
*EMBO J* 20 (2001) 2472-2479.
- <sup>50</sup> T. Palmer, F. Sargent, B.C. Berks,  
Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway,  
*TRENDS in Microbiology* 13 (2005) 175-180.
- <sup>51</sup> S. Schreiber, R. Stengel, M. Westermann, R. Volkmer-Engert, O.I. Pop, J.P. Müller,  
Affinity of TatC<sub>d</sub> for TatA<sub>d</sub> elucidates its receptor function in the *Bacillus subtilis* twin arginine translocation (Tat) translocase system,  
*J Biol Chem.* 281 (2006) 19977-19984.
- <sup>52</sup> N.N. Alder, S.M. Theg,  
Energetics of protein transport across biological membranes:  
A study of the thylakoid ΔpH-dependent/cpTat pathway.  
*Cell* 112 (2003) 231-242.
- <sup>53</sup> S.M. Musser, S.M. Theg,  
Proton transfer limits protein translocation rate by the thylakoid DeltapH/Tat machinery,  
*Biochemistry* 39 (2000) 8228-8233.

- 
- <sup>54</sup> M.P. DeLisa, D. Tullman, G. Georgiou,  
Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 6115-6120.
- <sup>55</sup> C. Sanders, N. Wethkamp, H. Lill,  
Transport of cytochrome c derivatives by the bacterial Tat protein translocation system,  
Mol. Microbiol. 41 (2001) 241-246
- <sup>56</sup> A. Rodrigue, A. Chanal, K. Beck, M. Muller, L.F. Wu,  
Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial Tat pathway,  
J Biol Chem 274 (1999) 13223-13228.
- <sup>57</sup> R.J. Turner, A.L. Papish, F. Sargent,  
Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs),  
Can. J. Microbiol. 50 (2004) 225-238.
- <sup>58</sup> R.L. Jack, G. Buchanan, A. Dubini, K. Hatzixanthis, T. Palmer, F. Sargent,  
Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins,  
EMBO J 23 (2004) 3962-3972.
- <sup>59</sup> A.L. Papish, C.L. Ladner, R.J. Turner,  
The twin-arginine leader-binding protein, DmsD, interacts with the TatB and TatC subunits of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase.  
J. Biol. Chem. 278 (2003) 32501-32506.
- <sup>60</sup> K. Schaerlaekens, L. Van Mellaert, E. Lammertyn, N. Geukens, J. Anné,  
The importance of the Tat-dependent protein secretion pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in *tat* deletion mutants and genome analysis,  
Microbiology 150 (2004) 21-31.
- <sup>61</sup> J.D.H. Jongbloed, U. Grieger, H. Antelmann, M. Hecker, R. Nijland, S. Bron, M.J. van Dijl,  
Two minimal Tat translocases in *Bacillus*,  
Mol. Mikrobiol. 54 (2004) 1319-1325.
- <sup>62</sup> J. D.H. Jongbloed, R. van der Ploeg, J. M. van Dijl,  
Bifunctional TatA subunits in minimal Tat protein translocases,  
TRENDS in Microbiology 14 (2006) 2-4.
- <sup>63</sup> O.I. Pop, M. Westermann, R. Volkmer-Engert, D. Schulz, C. Lemke, S. Schreiber, R. Gerlach, R. Wetzker, J.P. Müller,  
Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*,  
J. Biol. Chem. 278 (2003) 38428-38436.

- 
- <sup>64</sup> C.M. Fraser, J.D. Gocayne, O. White, M.D. Adams, R.A. Clayton, R.D. Fleischmann, C.J. Bult, A.R. Kerlavage, G. Sutton, J.M. Kelley, J.L. Fritchman, J.F. Weidman, K.V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T.R. Utterback, D.M. Saudek, C.A. Phillips, J.M. Merrick, J.F. Tomb, B.A. Dougherty, K.F. Bott, P.C. Hu, T.S. Lucier, S.N. Peterson, H.O. Smith, C.A. Hutchison, C.J. Venter, The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*, *Science* 270 (1995) 397–403.
- <sup>65</sup> M. Radermacher, Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series, *J. Electron. Microsc. Tech.* 4 (1988) 359-394.
- <sup>66</sup> S.Q. Zheng, J.M. Kollman, M.B. Braunfeld, J.W. Sedat, D.A. Agard, Automated acquisition of electron microscopic random conical tilt sets. *J Struct Biol.* 157 (2006) 148-55.
- <sup>67</sup> R.D. Krueger-Koplin, P.L. Sorgena, S.T. Krueger-Koplin, I.O. Rivera-Torres, S.M. Cahilla, D.B. Hicks, L. Griniusc, T.A. Krulwich, M.E. Girvin, An evaluation of detergents for NMR structural studies of membrane proteins *Journal of Biomolecular NMR* 17 (2004) 43-57.
- <sup>68</sup> X. Gong, J. Choi, C.M. Franzin, D. Zhai, J.C. Reed, F.M. Marassi, Conformation of Membrane-associated Proapoptotic tBid, *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 28954–28960.
- <sup>69</sup> C.R. Sanders, G.C. Landis, Reconstitution of membrane proteins into lipid bilayered mixed micelles for NMR studies, *Biochemistry* 34 (1995) 4030-4040.
- <sup>70</sup> C.R. Sanders, J.P. Schwonek, Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR, *Biochemistry* 31 (1992) 8898–8905.
- <sup>71</sup> R.S. Prosser, J.S. Hwang, R.R. Vold, Magnetically Aligned Phospholipid Bilayers with Positive Ordering: A New Model Membrane System, *Biophysical Journal* 74 (1998) 2405-2418.
- <sup>72</sup> L. van Dam, G. Karlsson, K. Edwards, Direct observation and characterization of DMPC/DHPC aggregates under conditions relevant for biological solution NMR, *Biochimica et Biophysica Acta* 1664 (2004) 241–256.
- <sup>73</sup> T.A. Harroun, M. Koslowsky, M. Nieh, C. de Lannoy, V.A. Raghunathan, J. Katsaras, Comprehensive Examination of Mesophases Formed by DMPC and DHPC Mixtures, *Langmuir* 21 (2005) 5356-5361.

- 
- <sup>74</sup> S. Prosser, University of Toronto  
(<http://biophysics.uoguelph.ca/molecular/faculty/prosser.htm>)
- <sup>75</sup> S.H. White, W.C. Wimley,  
Membrane protein folding and stability: physical principles,  
*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28 (1999) 319–365.
- <sup>76</sup> W. Moffitt,  
Optical rotatory dispersion of helical polymers,  
*J. Chem. Phys.* 25 (1956) 467-478.
- <sup>77</sup> Y. Wu, H.W. Huang, G.A. Olah,  
Method of oriented circular dichroism  
*Biophys. J.* 57 (1990) 797-806.
- <sup>78</sup> R. Griffin,  
Dipolar recoupling in MAS spectra of biological solids,  
*Nat. Struct. Biol. NMR II Suppl.* 5 (1998) 508–512.
- <sup>79</sup> S.O. Smith, K. Ascheim, M. Groesbeck,  
Magic angle spinning NMR spectroscopy of membrane proteins,  
*Q. Rev. Biophys.* 29 (1996) 395–449.
- <sup>80</sup> L.M. McDowell, J. Schaefer,  
High resolution NMR of biological solids,  
*Curr. Opin. Struct. Biol.* 6 (1996) 624–629.
- <sup>81</sup> R. Winter, F. Noll  
Methoden der Biophysikalischen Chemie,  
Teubner Studienbucher (1998)
- <sup>82</sup> S.E. Afonin,  
Structural studies on membrane-active peptides in lipid bilayers by solid state <sup>19</sup>F-NMR,  
Doktorarbeit (2004)
- <sup>83</sup> C.A. Fyfe,  
Solid State NMR for Chemists,  
CFC Press. Ontario, Canada (1983)
- <sup>84</sup> B. Bechinger, C. Sizun,  
Alignment and Structural Analysis of Membrane Polypeptides by <sup>15</sup>N and <sup>31</sup>P Solid-State  
NMR Spectroscopy,  
*Concepts in Magnetic Resonance* 18 (2003) 130-145.
- <sup>85</sup> J. Herzfeld, A.E. Berger,  
Side band intensities in NMR spectra of samples spinning at the magic angle,  
*J. Chem. Phys.* 73 (1980) 6021-6030.

- 
- <sup>86</sup> U. Haeberlen,  
Advances in Magnetic Resonance,  
New York (1976).
- <sup>87</sup> <http://anorganik.uni-tuebingen.de/klaus/nmr/conventions/csa/csa.html>
- <sup>88</sup> C.H. Wu, A. Ramamoorthy, S.J. Opella,  
High resolution heteronuclear dipolar solid-state NMR spectroscopy,  
J. Magn. Reson. 109 (1994) 270–272.
- <sup>89</sup> J. Wang, J. Denny, C. Tian, S. Kim, Y. Mo, F. Kovacs, Z. Song, K. Nishimura,  
Z. Gan, R. Fu, J.R. Quine, T.A. Cross,  
Imaging Membrane Protein Helical Wheels,  
Journal of Magnetic Resonance 144 (2000) 162–167.
- <sup>90</sup> F.M. Marassi, S.J. Opella,  
A solid-state NMR index of helical membrane protein structure and topology,  
J. Magn. Reson. 144 (2000) 150–155.
- <sup>91</sup> S.J. Opella, F.M. Marassi,  
Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy,  
Chem. Rev. 104 (2004) 3587–3606.
- <sup>92</sup> M. Schiffer, A.B. Edmunson,  
Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with  
helical potential,  
Biophys. J. 7 (1967) 121-135.
- <sup>93</sup> F.M. Marassi, S.J. Opella, Simultaneous assignment and structure  
determination of a membrane protein from NMR orientational  
restraints, Protein Sci. 12 (2003) 403–411.
- <sup>94</sup> S.H. Park, S. Prytulla, A.A. De Angelis, J.M. Brown, H. Kiefer, S.J. Opella,  
High-resolution NMR spectroscopy of a GPCR in aligned bicelles,  
J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 7402–7403.
- <sup>95</sup> L. Czerski, C.R. Sanders,  
Functionality of a membrane protein in bicelles,  
Anal. Biochem. 284 (2000) 327-333.
- <sup>96</sup> S.H. Park, A.A. De Angelis, A.A. Nevzorov, C.H. Wu, S.J. Opella,  
Three-Dimensional Structure of the Transmembrane Domain of Vpu from  
HIV-1 in Aligned Phospholipid Bicelles,  
Biophysical Journal 91 (2006) 3032–3042.
- <sup>97</sup> A.A. De Angelis, S.C. Howell, A.A. Nevzorov, S.J. Opella,  
Structure Determination of a Membrane Protein with Two  
Transmembrane Helices in Aligned Phospholipid Bicelles by  
Solid-State NMR Spectroscopy,  
J. AM. CHEM. SOC. 128 (2006) 12256-12267.

- 
- <sup>98</sup> A.A. Nevzorov, S.J. Opella,  
A “magic sandwich” pulse sequence with reduced offset dependence for high-resolution separated local field spectroscopy.  
*J. Magn. Reson.* 164 (2003) 182–186.
- <sup>99</sup> O.I. Pop, M. Westermann, R. Volkmer-Engert, D. Schulz, C. Lemke, S. Schreiber, R. Gerlach, R. Wetzker, J.P. Müller, Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*,  
*J. Biol. Chem.* 278 (2003) 38428–38436.
- <sup>100</sup> F. Delaglio, S. Grzesiek, G.W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax,  
NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes,  
*J. Biomol. NMR.* 6 (1995) 277–293.
- <sup>101</sup> T.D. Goddard, D.G. Kneller,  
SPARKY 3,  
University of California, San Francisco.
- <sup>102</sup> W.A. Whalen, C.M. Berg,  
Analysis of an avtA::Mu dl(Ap lac) Mutant: Metabolic Role of Transaminase C,  
*Journal of Bacteriology* 150 (1982) 739-746.
- <sup>103</sup> W.A. Whalen, C.M. Berg,  
Gratuitous Repression of avtA in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*,  
*Journal of Bacteriology* 158 (1984) 571-574.
- <sup>104</sup> <http://www.avantilipids.com/LUVET.html>
- <sup>105</sup> A. Pines, M.G. Gibby, J.S. Waugh,  
Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids,  
*J. Chem. Phys.* 59 (1973) 569-590.
- <sup>106</sup> S.R. Hartmann, E.L. Hahn,  
Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame,  
*Phys. Rev.* 128 (1962) 2042-2053.
- <sup>107</sup> A. Ramamoorthy, Y. Wei, D.K. Lee,  
PISEMA Solid-State NMR Spectroscopy,  
*Annual Reports of NMR Spectroscopy* 52 (2004) 1-52.
- <sup>108</sup> M. Lee, W.I. Goldberg,  
Nuclear magnetic resonance line narrowing by a rotating rf field,  
*Phys. Rev. Lett.* 11 (1963) 255–258.
- <sup>109</sup> P. Palmas, P. Tekely, D. Canet,  
Local-field measurements on powder samples from polarization inversion of the rare-spin magnetization,  
*J. Magn. Reson. A* 104 (1993) 26–36.

- 
- <sup>110</sup> D.K. Lee, T. Narasimhaswamy, A. Ramamoorthy, PITANSEMA, a low-power PISEMA solid-state NMR experiment, *Chemical Physics Letters* 399 (2004) 359-362.
- <sup>111</sup> A.A. Nevzorov, S.J. Opella, Selective averaging for high-resolution solid-state NMR spectroscopy of aligned samples, *J. Magn. Reson.* (2006) Article in Press.
- <sup>112</sup> W.K. Rhim, A. Pines, J.S. Waugh, Violation of the spin-temperature hypothesis, *Phys. Rev. Lett.* 25 (1970) 218–220.
- <sup>113</sup> R. Witter, P. Gor'kov, M. Schmitt, D. Gauder.
- <sup>114</sup> M.H. Levitt, D. Suter, R.R. Ernst, Spin dynamics and thermodynamics in solid-state NMR cross polarization, *J. Chem. Phys.* 84 (1986) 4243–4255.
- <sup>115</sup> N. Sinha, C.V. Grant, C.H. Wu, A.A. De Angelis, S.C. Howell, S.J. Opella, SPINAL modulated decoupling in high field double and triple-resonance solid-state NMR experiments on stationary samples, *J. Magn. Reson.* 177 (2005) 197–202.
- <sup>116</sup> A.A. Nevzorov, S.J. Opella, Structural fitting of PISEMA spectra of aligned proteins, *J. Magn. Reson.* 160 (2003) 33–39.
- <sup>117</sup> Dr. Stephan Grage, unveröffentlichtes Programm zur Simulation von Festkörper-NMR-Spektren, (2007).
- <sup>118</sup> P.G. Saffman, M. Delbrück, Brownian motion in biological membranes (diffusion), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3111-3113.
- <sup>119</sup> <http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>
- <sup>120</sup> F.D. Sönnichsen, J.E. Van Eyk, R.S. Hodges, B.D. Sykes, Effect of Trifluoroethanol on Protein Secondary Structure: An NMR and CD Study Using a Synthetic Actin Peptide, *Biochemistry* 31 (1992) 8790-8798.
- <sup>121</sup> F.Y. Chen, M.T Lee, H.W. Huang, Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin, *Biophys. J.* 82 (2002) 908–914.

- 
- <sup>122</sup> M.D. Bazzi, R.W. Woddy,  
Interaction of amphipathic polypeptides with phospholipids: characterization of conformations and the CD spectra of oriented  $\beta$ -sheets,  
*Biopolymers* 26 (1987) 1115-1124.
- <sup>123</sup> T.M. Weiss, L. Yang, L. Ding, A.J. Waring, R.I. Lehrer, H.W. Huang,  
Two states of cyclic antimicrobial peptide RTD-1 in lipid bilayers,  
*Biochem.* 41 (2002) 10070-10076.
- <sup>124</sup> C.E. MacPhee, M.A. Perugini, H.W. Sawyer, G.J. Howlett,  
Trifluoroethanol induces the self-association of specific amphipathic peptides,  
*FEBS Letters* 416 (1997) 265-268.
- <sup>125</sup> G.D. Henry, B.D. Sykes,  
Hydrogen exchange kinetics in a membrane protein determined by <sup>15</sup>N NMR spectroscopy: use of the INEPT experiment to follow individual amides in detergent-solubilized M13 coat protein,  
*Biochemistry* 29 (1990) 6303-6313.
- <sup>126</sup> L. Czerski, O. Vinogradova, C.R. Sanders,  
NMR-Based amide hydrogen-deuterium exchange measurements for complex membrane proteins: development and critical evaluation,  
*J. Magn. Reson.* 142 (2000) 111-119.
- <sup>127</sup> W. Mai, W. Hu, C. Wang, T.A. Cross,  
Orientational constraints as 3-dimensional structural constraints from chemical-shift anisotropy-The polypeptide backbone of gramicidin-A in a lipid bilayer,  
*Protein Sci.* 2 (1993) 532-542.
- <sup>128</sup> D. Fushman, D. Cowburn,  
Model-independent analysis of <sup>15</sup>N chemical shift anisotropy from NMR relaxation data. Ubiquitin as a test example,  
*J. Amer. Chem. Soc.* 120 (1998) 7109-7110.
- <sup>129</sup> M.I. Mikhaleva, C.L. Santini, G. Giordano, M.A. Nesmeyanova, L.F. Wu,  
Requirement for phospholipids of the translocation of the trimethylamine N-oxide reductase through the Tat pathway in *Escherichia coli*,  
*FEBS Lett.* 463 (1999) 331-335.
- <sup>130</sup> C. Tian, P.F. Gao, L.H. Pinto, R.A. Lamb, T.A. Cross,  
Initial structural and dynamic characterization of the M2 protein transmembrane and amphipathic helices in lipid bilayers,  
*Protein Sci.* 12 (2003) 2597-2605.
- <sup>131</sup> X. Gong, J. Choi, C.M. Franzin, D. Zhai, J.C. Reed, F.M. Marassi,  
Conformation of Membrane-associated Proapoptotic tBid,  
*Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 28954-28960.

- 
- <sup>132</sup> F.M. Marassi,  
A Simple Approach to Membrane Protein Secondary Structure and Topology based on NMR Spectroscopy,  
*Biophys. J.* 80 (2001) 994-1003.
- <sup>133</sup> S.H. Park, S.J. Opella,  
Tilt angle of a transmembrane helix is determined by hydrophobic mismatch,  
*J. Mol. Biol.* 350 (2005) 310–318.
- <sup>134</sup> J. U. Bowie,  
Helix Packing in Membrane Proteins,  
*J. Mol. Biol.* 272 (1997), 780-789.
- <sup>135</sup> B.A. Lewis, D.M. Engelman,  
Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles,  
*J. Mol. Biol.* 166 (1983) 211–217.
- <sup>136</sup> S. Kim, T.A. Cross,  
Uniformity, ideality and hydrogen bonds in transmembrane  $\alpha$ -helices,  
*Biophys. J.* 83 (2002) 2084-2095.
- <sup>137</sup> S.H. Park, A.A. Mrse, A.A. Nevzorov, A.A. De Angelis, S.J. Opella,  
Rotational diffusion of membrane proteins in aligned phospholipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy,  
*J. Magn. Reson.* 178 (2006) 162–165.
- <sup>138</sup> M.R. Yen, Y.H. Tseng, E.H. Nguyen, L.F. Wu,  
Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system,  
*Arch. Microbiol.* 177 (2002) 441–450.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

Zur Abkürzung der Aminosäuren werden die Einbuchstabenkodierungen nach Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für Biochemische Nomenklatur verwendet (Eur. J. Biochem. 138 (1984) 9-37).

Dem Englischen entnommene Fachausdrücke sind *kursiv* gedruckt.

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
6-O-PC	1,2- <i>O</i> -dihexyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Anschn.	Abschnitt
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Absorption unit</i>
B <sub>0</sub>	magnetische Feldstärke
CP	<i>cross polarization</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bidest.	bidestilliert
CD	<i>circular dichroism</i> (Cirkulardichroismus)
CMC	<i>critical micelle concentration</i>
CP-MOIST	<i>cross-polarization with mismatch optimized IS transfer</i>
CSA	<i>chemical shift anisotropy</i> (Anisotropie der chemischen Verschiebung)
Da	Dalton
DD	Dipol-Dipol-
dest.	destilliert
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure

---

DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]
DPC	Dodecylphosphocholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FFLG	flip-flop-Lee-Goldburg
FID	<i>free induction decay</i>
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
g	Gramm
$\gamma$	gyromagnetisches Verhältnis
$\eta$	mikroskopische Viskosität
h	Stunden
His-Tag	Hexahistidin-Anhang
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<i>I-state</i>	<i>inserted state</i>
$k_B$	Boltzmann-Konstante
Kan	Kanamycin
Kan50	Kanamycin in einer Konzentration von 50 $\mu$ g/ml
LB	Luria Bertani
LPPG	1-Palmitoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho- <i>RAC</i> -(1-glycerol)]
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
M	molar
mA	Milliampere
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar

---

MP	<i>multiple pulse sequences</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NLS	N-Lauroylsarcosin
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OCD	<i>oriented circular dichroism</i> (Orientierter Cirkulardichroismus)
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	<i>principal axes system</i>
PB	<i>phosphate buffer</i> (Phosphat-Puffer)
pH	<i>pondus/potentia Hydrogenii</i> (pH-Wert)
PhoD	Phosphodiesterase
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PISA	<i>polarity index slant angle</i>
PISEMA	<i>polarization inversion spin exchange at the magic angle</i>
P/L	Protein-Lipid-Verhältnis
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]
ppm	<i>parts per million</i>
q	Verhältnis langkettige zu kurzkettige Lipide (in Bizellen)
REMP	<i>redox enzyme maturation protein</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
σ	chemische Verschiebung
SA	Sinapinsäure <i>Trans</i> -3,5-Dimethoxy-

---

	4-hydroxyzimtsäure
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Sec	<i>secretory-</i>
<i>S-state</i>	<i>surface state</i>
SUV	<i>small unilamellar vesicles</i>
T <sub>1</sub>	longitudinale Relaxationszeit
Tat	<i>twin arginine translocation</i>
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
WW	Wechselwirkung

## 8.2. Geräte

Autoklav	Varioklav , H + P Labortechnik GmbH Sanoclav S-ECZ, Wolf
Brutschrank	Incucell, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH
CD Spectropolarimeter: J-810	Jasco
French-Press	SLM-Aminco Spectronic Instruments
Gasbrenner	Schütt flammly S, Schütt Labortechnik GmbH
Geldokumentationssystem:	
Photo-Print	
Video-Geldokumentationssystem	21 5-SI, PeqLab Biotechnologie GmbH
Gelelektrophorese (Agarose)	40-0708, PeqLab Biotechnologie GmbH
Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	Mini-Protean 3 Cell, BioRad
Gradi Frac	Pharmacia Biotech
Superloop™	GE Healthcare
Heizblock	HB-2, Wealtec Corp.
Inkubationsschüttler	G25, New Brunswick Scientific GmbH
Gefrierschrank (- 80°C)	Herafreeze, Heraeus Instruments
Lyophilisator	Alpha I-6, Christ
Magnetrührer	MR 80, Heidolph RCT, IKA Labortechnik
Massenspektrometer (MALDI-TOF)	Bruker Daltonics

---

- Reflex III	
- Biflex IV	
Membranpumpstation	MZ 2C, Vacuubrand
NMR-Spektrometer (500MHz, 600MHz)	Bruker Avance II
pH-Messgerät	QpH 70, VWR International GmbH
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
Reinraumbank	Herasafe, Heraeus Instruments
Reinstwasseranlage	Millipore
Säulen für die Chromatographie:	
Gelsäulen:	
Superdex 200 prep grade	GE Healthcare
HiPrep™Sephacryl™ S-100 HR	GE Healthcare
Ni-NTA-Säulen:	
His-Trap 5ml FF	GE Healthcare
Econo columns	Bio-Rad
Schüttler	KS 250 basic, IKA Labortechnik
SpeedVac	Univapo 100 H
Stromversorger	E455, Consort
	Power Pac 300, BioRad
	Power Pac Basic, BioRad
Trockenschrank	600, Memmert GmbH + Co.KG
Ultraschallgeräte	Branson Sonifier 250, G. Heinemann
	Ultraschall und Labortechnik
	Sonorex super RK510, Bandelin electronic
Ultrazentrifuge	L8-M, Beckmann
Vortexer	Genie K-550-GE, Bender und Hobein AG
Waagen	
Ablesbarkeit 0,1 g	PB 3001, Mettler Toledo
Ablesbarkeit 0,0001 g	A 200 S, Sartorius analytic
	CP 64, Sartorius
Ablesbarkeit 0,001 mg	M2P

---

Wasserbad	1008, Gesellschaft für Labortechnik GmbH B-480, Büchi Waterbath
Wasserbad Thermostat	U3 - 7A, Julabo
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
Zentrifugenrotoren	19776-H, Sigma 50Ti, Beckmann J-Lite Series Rotor, Beckmann SLA-3000 Super-Lite GS-3, Sorvall

### 8.3. Verbrauchsmaterialien

Alufolie	Roth
Autoklavierband	Comply Indicator Tape, 3M
Bio-Beads™ SM-2	BIO-RAD
Centricon® (MWCO = 2,5 kDa)	Millipore
Deckgläser (für orientierte NMR-Proben, 18 mm x 7,5 mm x 60µm)	Marienfeld
Dialysiermembran Float-A-Lyzer® (MWCO = 3,5 kDa, 10ml Volumen)	Spectrum Laboratories Inc.
Dialyseschläuche aus regenerierter Zellulose (MWCO = 2,0 kDa)	Spectra/Por
Einmalspritzen (20 ml, 10ml, 1 ml)	Inject, B. Braun
Einmalsterilfilter (0,22 µm)	Rotilabo
Einmalsterilfilter (0,45 µm), unsteril	Roth
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt

---

Falcon™-Zentrifugationsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Halbmikroküvetten (1 ml)	Sarstedt
Gummistopfen für 5 mm NMR-Geäß (aus 1 mm Spritze: 1 ml Sub-Q, 0,45 mm x 16 mm)	Becton Dickinson&CO
Ni-NTA-Harz	EMD/Novagen
NMR-Gefäß (5 mm <i>Flat BTM Cell</i> )	Newera NE-RG5-15-FB
Parafilm	Laboratory film, American National Can
Petri Schalen	Sarstedt
Pipettenspitzen 1 ml, 200 µl, 10 µl	Sarstedt
5 ml	Finnpipette
Quarzglas	Suprasil QS, Hellma Optik, Jena
Rührzelle (1 kDa, 3 kDa MWCO, Omega Cell)	Pall
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann
Wägebapier	MN 226, Macherey-Nagel
Wägeschälchen	Roth

#### 8.4. Chemikalien

6-O-PC	Avanti Polar Lipids
Acrylamid	Applichem
Agar	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Acros Organics
Ammoniumsulfat ( <sup>15</sup> N-markiert)	Spectra Stable Isotopes
Ammoniumchlorid	Fluka
Ammoniumchlorid ( <sup>15</sup> N-markiert)	Spectra Stable Isotopes
Benzamidin-Hydrochlorid	Merck
Benzonase	Merck
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Roth

---

Chloroform	Roth
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem
D-Pantothenat	AppliChem
DMPG	Avanti Polar Lipids
DMPC	Avanti Polar Lipids
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Fluka
Essigsäure	Roth
Eisen(II)-Sulfat	Fluka
Ethanol	Merck
Glucose	Fluka
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
Natriumhydroxid	Riedel - de Haën
Natriumlauroylsarcosin (NLS)	Fluka
Natriumphosphat	Fluka
Niacinamid	AppliChem

Nickelsulfat	Fluka
Pefabloc	Roth
POPC	Avanti Polar Lipids
POPG	Avanti Polar Lipids
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Quartzplatten	
Salzsäure	Roth
Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
Thiamin-Hydrochlorid	AppliChem
Trifluoressigsäure	Roth
Trifluorethanol	Acros Organics
Tris	AppliChem
Tris-Hydrochlorid	Roth
Trypton	Roth
Zinksulfat	AppliChem

## 8.5. Peaklisten

Position der Signale des HSQC-Spektrums von uniform markiertem  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>2-45</sub> in SDS-Mizellen (2 mg Protein, 450 mM SDS<sub>d25</sub>, 10 mM Natriumphosphatpuffer pH = 6,0, T = 50°C).

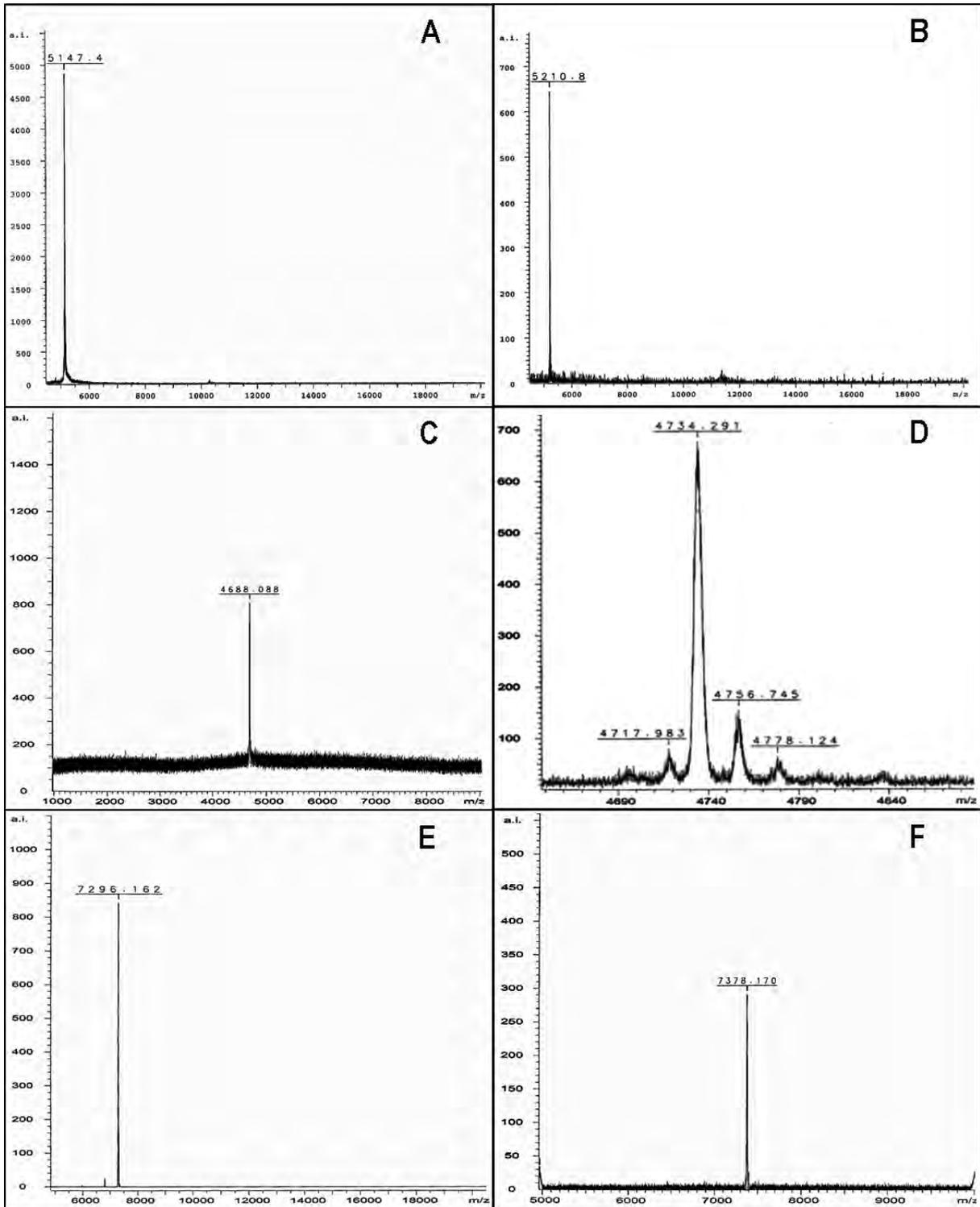
$^{15}\text{N}$ chemische Verschiebung / ppm	$^1\text{H}$ chemische Verschiebung / ppm	$^{15}\text{N}$ chemische Verschiebung / ppm	$^1\text{H}$ chemische Verschiebung / ppm
124,066	7,857	117,927	8,227
122,104	8,335	117,891	8,117
121,732	8,717	117,864	7,696
121,099	7,942	117,758	8,536
120,874	8,056	117,440	8,100
120,390	8,139	117,360	8,160
120,371	8,474	117,335	8,216
120,120	7,894	116,173	7,914
119,916	8,094	115,856	8,580
119,538	8,310	115,709	7,579

119,284	8,194	113,767	7,970
119,281	8,110	113,367	7,508
118,972	7,855	112,596	8,202
118,944	8,454	112,047	8,138
118,849	8,139	110,972	7,818
118,756	8,335	110,972	7,810
118,418	8,339	108,133	7,970
118,183	8,661	107,335	8,796
105,191	8,635	103,447	7,816
120,914	8,566		

Position und Linienbreite (berechnet vom Programm Sparky) der Signale des PISA-*wheels* aus dem SAMMY-Spektrum von uniform markiertem  $^{15}\text{N}$ -TatA<sub>2-45</sub> in Bizellen (3mg Protein in DMPC/DMPG (80:20)/ 6-O-PC-Bizellen ( $q = 3,2$ ) pH = 6,8, T = 42°C).

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ Kopplung / kHz	$^{15}\text{N}$ CSA / ppm	Linienbreite $\omega_1$ (auf halber Signalthöhe) / Hz	Linienbreite $\omega_2$ (auf halber Signalthöhe) / Hz
2,522	85,0	280	131
2,553	91,7	219	156
2,783	82,4	170	157
3,021	79,5	175	150
3,060	91,2	276	147
3,377	78,4	184	167
3,403	94,6	194	150
3,566 (Val15)	82,3 (Val15)	226	145
3,796	91,9	287	146
3,869	80,2	212	142
4,082	84,1	170	144
4,126	89,2	180	134

## 8.6. MALDI-TOF-Spektren



MALDI-TOF-Spektren der TatA-Konstrukte. (A) TatA<sub>22-70</sub>; (B) <sup>15</sup>N-TatA<sub>22-70</sub>; (C) <sup>15</sup>N-Leu-TatA<sub>2-45</sub>; (D) <sup>15</sup>N-TatA<sub>2-45</sub>; (E) TatA<sub>d</sub>; (F) <sup>15</sup>N-TatA<sub>d</sub>.

---

## 8.7. Publikationsliste

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

C. Lange, S. D. Müller, T. H. Walther, J. Bürck, and Anne S. Ulrich,  
eingereicht bei *BBA-Biomembranes*.

- (2) “Structural characterization of the pore forming protein TatA<sub>d</sub> of the twin-arginine translocase in membranes by solid-state <sup>15</sup>N-NMR”

S. D. Müller, A. A. De Angelis, T. H. Walther, S. L. Grage, C. Lange, S. J. Opella and  
A. S. Ulrich  
eingereicht bei *BBA-Biomembranes*.

## 8.8. Tagungsbeiträge

- (1) “<sup>19</sup>F-Labeling of recombinant proteins for solid state NMR structure analysis in oriented membranes”

S. D. Müller, S. Afonin, C. Lange, M. Berditsch, A. S. Ulrich;  
*49th Annual Meeting der Biophysical Society, Long Beach (California, USA) 2005.*

- (2) “Structural analysis of TatA<sub>d</sub> by solid state NMR-spectroscopy”

S. D. Müller, C. Lange, S. L. Grage, M. Berditsch, A. S. Ulrich;  
*1st International Workshop on Expression, Structure and Function of Membrane Proteins Florenz (I) 2006.*

## 9. Lebenslauf

### SONJA DENISE MÜLLER

#### PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum	10.01.1978
Geburtsort	Karlsruhe

#### SCHULAUSSBILDUNG

09/ 1984 – 07/ 1988	Grundschule Ettlingen
08/ 1988 – 06/ 1997	Eichendorff-Gymnasium Ettlingen
06/ 1997	Abitur

#### BERUFLICHE PRAXIS/ PRAKTIKA

10/ 1997 – 08/ 1998	Volontariat im Badischen Landesmuseum Karlsruhe Restaurierung und Konservierung von historischen Objekten
---------------------	--

#### HOCHSCHULAUSSBILDUNG

Seit 10/ 1998	Diplomstudium Chemie, Universität Karlsruhe (TH)
02/ 2001 – 07/ 2001	Université Méditerranée Aix-Marseille, Auslandssemester im Rahmen des Erasmus- Austauschprogramms
08/ 2003 – 02/ 2004	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie der Universität Karlsruhe (TH) bei Prof. Dr. Anne S. Ulrich; Thema: „ <i>In vivo</i> Markierung der Proteine GB1 und Tata mit Fluorderivaten aromatischer Aminosäuren“

#### PROMOTION

05/ 2004 – 07/ 2007	Promotion am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie der Universität Karlsruhe (TH)/ Institut für biologische Grenzflächen, Forschungszentrum Karlsruhe unter Anleitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich; Thema: „Strukturuntersuchungen am bakteriellen Tat- Proteinexportsystem“
09/ 2006 – 12/ 2006	Aufenthalt an der University of California, San Diego in der Gruppe von Prof. Dr. Stanley J. Opella (USA) mit einem Doktorandenkurzstipendium des DAAD