

**Zur Substratspezifität und Substratbindung des
periplasmatischen Chaperons SurA aus *Escherichia coli***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Gerrit Hennecke

aus Göttingen

Göttingen 2005

D7

Referent: PD Dr. Wilfried Kramer

Korreferent: PD Dr. Andreas Schwienhorst

Tag der mündlichen Prüfung: 1. November 2005

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE FALTUNG VON PROTEINEN ALS ENERGETISCHER PROZESS.....	1
1.2 FALTUNGSHELFER IM CYTOPLASMA.....	2
1.3 FALTUNGSHELFER IM PERIPLASMA.....	4
1.4 SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE ZUR STREBWAHRNEHMUNG.....	5
1.5 PROTEINE DER ÄUßEREN MEMBRAN.....	6
1.6 DAS MALTULOSE-BINDEPROTEIN LAMB.....	8
1.7 DAS OUTER MEMBRANE PROTEIN F.....	10
1.8 DAS OUTER MEMBRANE PROTEIN A.....	11
1.9 ZUR BIOGENESE DER OUTER MEMBRANE PROTEINS.....	12
1.9.1 Die Reifung von OMPs wird durch Faltungshelfer unterstützt.....	12
1.9.2 Die PPIase SurA als Faltungshelfer im Periplasma.....	13
1.10 ZIELSETZUNG.....	17
2 MATERIAL	18
2.1 BAKTERIENSTÄMME.....	18
2.2. PLASMIDE.....	18
2.2.1 pASKSurA und abgeleitete Konstrukte.....	18
2.2.2 pASKSurASacI.....	19
2.3 OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE.....	19
2.4 ENZYME UND PROTEINE.....	20
2.5 CHEMIKALIEN.....	21
2.6 SONSTIGE MATERIALIEN UND GERÄTE.....	23
2.7 NÄHRMEDIEN ZUR ANZUCHT VON ESCHERICHIA COLI.....	27
2.8 LÖSUNGEN UND PUFFER.....	28
3 METHODEN	35
3.1 MIKROBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN.....	35
3.1.1 Stammhaltung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	35
3.1.2 Vermehrung von <i>E. coli</i>	35
3.1.3 Bestimmung der Zelldichte.....	35
3.1.4 Präparation und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock.....	35
3.1.5 Präparation elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen.....	36
3.1.6 Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Elektroporation.....	36
3.1.7 Induktion der Proteinproduktion.....	36
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN.....	37
3.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen.....	37
3.2.2 Fällung von DNA aus wäßrigen Lösungen.....	37
3.2.2.1 Fällung von DNA mit Ethanol.....	37
3.2.2.2 Fällung von DNA mit Isopropanol.....	37
3.2.3 Extraktion von DNA in wäßrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln.....	38
3.2.3.1 Präparation einer Phenollösung.....	38
3.2.3.2 Extraktion von DNA mit Phenol, Phenol/Chloroform oder Chloroform.....	38
3.2.4 Agarosegelelektrophorese.....	38
3.2.5 Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe des Nucleotrap®-Kits.....	39
3.2.6 Abtrennung von Oligonukleotiden und kurzen DNA-Fragmenten mit Hilfe des NucleotraPCR®-Kits.....	39
3.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration in wäßrigen Lösungen.....	40
3.2.8 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40

3.2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation) mittels alkalischer Lyse.....	40
3.2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi-Präparation) mit Hilfe des JetStar-Kits.....	40
3.3 ENZYMATISCHE MANIPULATION VON DNA.....	41
3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	41
3.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten.....	41
3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	41
3.3.4 Kolonie-Durchmusterung mittels PCR.....	43
3.3.5 <i>Quick change mutagenesis</i> PCR (Stratagene).....	43
3.3.6 Auffüllen von überhängenden Enden mit T4-DNA-Polymerase.....	44
3.4 BIOCHEMISCHE ARBEITSMETHODEN.....	44
3.4.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese.....	44
3.4.1.1 Herstellung 12,5 %iger (v/v) Polyacrylamidgele.....	44
3.4.1.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	45
3.4.1.3 Coomassie-Färbung eines SDS-Polyacrylamidgels.....	45
3.4.1.4 Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels.....	45
3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen.....	46
3.4.3 Isolierung von Proteinen aus <i>E. coli</i>	46
3.4.3.1 Isolierung periplasmatischer Proteine aus <i>E. coli</i> im präparativen Maßstab.....	46
3.4.3.2 Gewinnung von Gesamtzellextrakt von <i>E. coli</i> Zellen.....	47
3.4.4 Reinigung von Proteinen.....	47
3.4.4.1 Reinigung über immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC).....	47
3.4.4.2 Proteinreinigung mittels Gelfiltrations-Chromatographie.....	48
3.4.4.3 Konzentrieren von Proteinlösungen mit <i>Vivaspin</i> -Konzentratoren.....	48
3.4.4.4 Dialyse von Proteinlösungen.....	48
3.4.4.5 Lagerung der SurA-Proteine.....	49
3.4.5 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose -Membranen über die Bindung von Antikörper-gekoppelter Alkalischer Phosphatase (Western Blot).....	49
3.4.6 Durchmusterung Zellulose-gebundener Peptid-Bibliotheken nach Bindern für SurA.....	50
3.5 SPEKTROSKOPISCHE METHODEN.....	51
3.5.1 <i>Electron paramagnetic resonance</i> (EPR) Spektroskopie MTSSL markierter Proteine.....	51
3.5.2 Modifikationen von SurA-Cys-Proteinen mit der Radikalsonde MTSSL.....	56
3.5.2.1 Kopplung von MTSSL an immobilisierte SurA-Cys-Proteinen.....	56
3.5.2.2 Messung des Immobilisationsgrades von MTSSL in SurA-Cys-Proteinen.....	56
3.5.3 <i>Surface plasmon resonance</i> (SPR) Spektroskopie.....	56
3.5.3.1 Immobilisierung von Peptiden auf der Oberfläche eines Sensor-Chips C1.....	59
3.5.3.2 SPR-Interaktionsanalyse von SurAN+ICt mit ausgewählten Peptiden.....	60
3.5.4 Fluoreszenzspektroskopie.....	61
3.5.4.1 Studien zur Spezifität und Affinität der Interaktion zwischen Peptid und Protein mit extrinsischer Fluoreszenz.....	61
3.5.5 Bestimmung der Chaperonaktivität von SurA mittels Analyse der thermalen Aggregation von Citrat-Synthase.....	62
3.5.5.1 Überprüfung der SurA-Präparation auf Proteaseaktivität.....	64
3.6 STATISTISCHE ANALYSEN.....	64
3.6.1 Auswertung von Fluorogrammen mit <i>Scion</i>	64
3.6.2 Klassifizierung der Peptide nach relativer Intensität.....	64
3.6.3 Auswertung der klassifizierten Peptide.....	65
3.6.4 Kumulative Häufigkeit von Aminosäuren der Peptid-Bibliotheken.....	65
3.6.5 Bioinformatische Analysen von Mustern aromatischer Aminosäuren.....	66
4 ERGEBNISSE.....	68
4.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR SUBSTRATSPEZIFITÄT VON SURA.....	68
4.1.1 Bindung von SurA an Porin Peptid-Bibliotheken.....	68
4.1.2 Klassifizierung der Peptide nach relativen Bindungsaffinitäten.....	70
4.1.3 Analyse der Aminosäurezusammensetzung klassifizierter Peptide.....	72

4.1.4 Ermittlung eines theoretisch besten Binders für SurA in den Porin Peptid-Bibliotheken.....	74
4.1.5 Analysen zur Positionierung aromatischer Aminosäuren in SurA-bindenden Peptide	76
4.1.6 Strukturanalyse der Peptide der Porin-Bibliotheken	79
4.1.7 Lokalisierung aromatischer Muster in den nativen Strukturen von LamB, OmpF und OmpA	81
4.1.8 Interaktionsanalyse zwischen SurAN+ICt und Peptiden mittels SPR-Spektroskopie	83
4.1.9 Studien zur Spezifität und Affinität der Interaktion zwischen Peptiden und SurA mit Fluoreszenzspektroskopie	85
4.2 LOKALISATION VON PEPTID-BINDESTELLEN AUF DER OBERFLÄCHE VON SURA MITTELS EPR.....	90
4.2.1 Auswahl von Resten zur Markierung mit einer Radikalsonde.....	90
4.2.2 Generierung von SurA-Cys-Proteinen und Bestimmung der Chaperon-artigen Aktivität	93
4.2.3 Einfluss von Peptiden der Peptid-Bibliotheken auf ortsspezifische Sonden in SurA-Cys-Proteinen	96
5 DISKUSSION.....	102
5.1 ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SURA-BINDESTELLEN IN NATÜRLICHEN SUBSTRATEN VON SURA	102
5.1.1 Durchmusterung von Peptid-Bibliotheken zur Analyse der Substrat-spezifität von SurA.....	102
5.1.2 Charakteristika SurA-bindender Peptide.....	103
5.1.3 Zur Bindungsaffinität und Bindungsspezifität ausgewählter Peptide	108
5.1.4 Lokalisation der putativen SurA-Bindestellen in der nativen Struktur der OMPs....	109
5.2 ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTRAT-BINDUNGSSTELLEN IN SURA.....	110
5.2.1 Auswahl von Positionen in SurA zur ortsspezifischen Mutagenese	110
5.2.2 Aktivität generierter SurA-Cys-Proteine	112
5.2.3 Ortspezifische Radikalsonden zur Interaktionsanalyse zwischen SurA und Peptiden	113
5.3 ZUR ROLLE VON SURA IN DER PORINREIFUNG.....	115
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	118
7 LITERATURVERZEICHNIS	120
8 ANHANG.....	135
8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	135
8.2 SEQUENZEN & ZUSATZMATERIAL	136
8.3 DANKSAGUNGEN.....	148
8.4 LEBENS LAUF	150

1 Einleitung

1.1 Die Faltung von Proteinen als energetischer Prozeß

In jeder Zelle existieren molekulare Netzwerke aus Proteinen, die eine Vielfalt an Aufgaben erfüllen. Ihren Funktionen entsprechend, besitzen Proteine die unterschiedlichsten Strukturen, die durch individuelle Faltung der einem jeden Protein zugrunde liegenden Polypeptidkette gegeben ist. Der Prozeß der Faltung ist hoch komplex und bislang noch nicht vollständig aufgeklärt, obwohl die endgültige dreidimensionale Struktur nur von der intrinsischen Aminosäuresequenz eines Proteins abhängig ist (Anfinsen, 1973). Es ist noch nicht möglich, allein aus der Aminosäuresequenz eines Proteins auf die exakte native Struktur zu schließen, da viele Mechanismen, die bislang nur teilweise bekannt sind, an der dreidimensionalen Ausrichtung der Polypeptidkette beteiligt sind.

Auf der Ebene einer Peptideinheit sind drei mögliche Orientierungen (entsprechend den α -, β -, und *loop*-Konformationen) für Φ - und Ψ -Torsions-Winkel, durch die die Ausrichtung des Peptidrückrates und somit der Seitenketten bestimmt werden, gegeben (Anfinsen, 1972). Bei einer Polypeptidkette mit der Länge von beispielsweise 300 Aminosäuren existieren theoretisch $(3 \times 3)^{300}$ Anordnungen dieser Polypeptidkette. Das Einnehmen dieser stereochemischen Ausrichtungen der einzelnen Winkel würden zeitlich astronomische Ausmaße annehmen. Es sind jedoch thermodynamische Mechanismen vorhanden, die eine Faltung von Polypeptidketten in wesentlich kürzeren Zeiträumen ermöglichen. Ein natives Protein, welches selbst ein dynamisches System darstellt (Beece *et al.*, 1980), liegt generell in dem thermodynamisch günstigsten Zustand vor (Anfinsen, 1973). Die Faltung eines Proteins ist demnach ein Suchprozess nach dem Zustand mit der geringsten Gibb'schen freien Energie, welcher sich durch Faltungstrichter und Energielandschaften beschreiben lässt (Mogk *et al.*, 2002; Hagen, 2003). Der Verlauf der Faltung kann in einer solchen Energielandschaft in lokalen Tälern, also lokale Energieminima, verzögert oder gar zum stehen gebracht werden (Eaton *et al.*, 1996). Es sind dabei verschiedene Modelle für kinetische Faltungswege vorhanden, die über konformationelle Intermediate wie beispielsweise dem *molten globule*, einen Zustand mit partiell geordneten Strukturen, zu der nativen Form eines Proteins führen (Robson und Pain, 1976; Brandon und Tooze, 1999). Der Verlauf der Faltung hängt dabei von der Komplexität der Polypeptidkette, der Topologie des nativen Zustandes und den Bedingungen der Umgebung ab (Beece *et al.*, 1980). In Abb. 1 wird der Verlauf eines simplen Faltungsprozesses gezeigt, der über einen Zwischenzustand bergab zu dem Energieminimum, dem nativen Zustand gelangt. Dabei sind die energetischen Unterschiede zwischen dem ungefalteten und nativen Zustand relativ gering (5-15 kcal/mol) und zeigen das hochsensible Gleichgewicht zwischen diesen Energieniveaus auf (Brandon und Tooze, 1999).

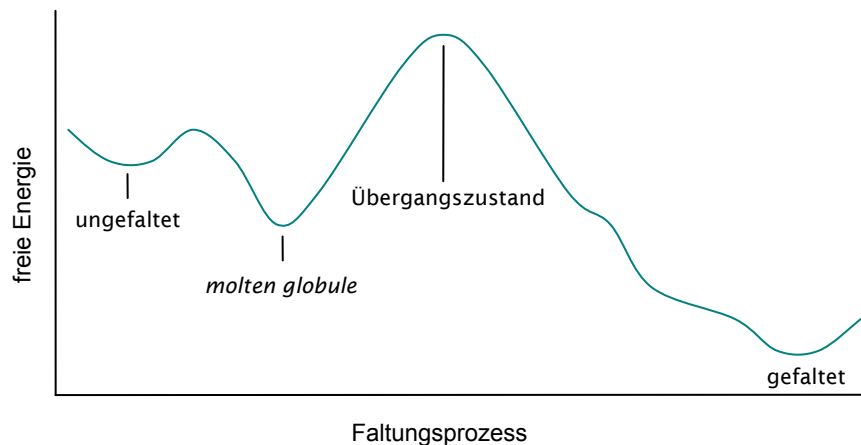


Abb. 1 Schematischer Verlauf des Energieniveaus während des Proteinfaltungsprozesses. Das Protein gelangt über Zwischenschritte von dem energiereichen ungefalteten Zustand zu dem energieärmeren nativen Zustand. Nach Brandon und Tooze, 1999.

Aus *in vitro* Experimenten ist bekannt, dass Proteine unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, selbstständig binnen Millisekunden aus einem denaturierten Zustand in die native Form zu falten (Anfinsen, 1973; Hartl und Hayer-Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Nach bisherigen Modellen kommt es dabei zunächst durch einen strukturellen Kollaps zu einer dem nativen Zustand ähnlichen Form. Anschließend wird über Wasserausschluss aus dem hydrophoben *core* die native Struktur, in der hydrophile Aminosäuren nach außen und hydrophobe nach innen gerichtet sind, erreicht (Dill *et al.*, 1995; Duan und Kollman, 1998; Cheung *et al.*, 2002). Interessanterweise ist die spontane Faltungsrate von homologen Proteinen aus pro- und eukaryotischen Systemen unterschiedlich; prokaryotische Proteine falten bedingt durch geringe Sequenzdifferenzen zu den eukaryotischen Homologen bis zu sechsmal schneller als ihre eukaryotischen Gegenstücke (Widmann und Christen, 2000).

1.2 Faltungshelfer im Cytoplasma

Nicht alle Proteine können ohne Hilfe spontan falten, da ab einer gewissen Länge der Polypeptidkette diese spontanen Faltungsprozesse nicht mehr in geordneter Weise und in zeitlich adäquaten Relationen ablaufen (Widmann und Christen, 2000). Die daraus hervorgehenden ungeordneten Aggregate sind zwar in ihrer Form recht kompakt, dennoch besitzen sie Bereiche mit exponierten hydrophoben Aminosäuren und unstrukturiertem Peptidrückrat (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Zudem ist die zelluläre Konzentration von Polypeptidketten recht hoch. Allein die Konzentration an Ribosomen liegt in *E.coli* bei ca. 50 μM , so dass die wachsende Polypeptidkette lokal sogar noch höhere Konzentrationen erreichen kann (Hlodan und Hartl, 1994). Bedingt durch dieses *molecular crowding* tendieren viele reifende Proteine zur Aggregation, wodurch fehlgefaltete Intermediate entstehen können, die

ohne Hilfe die native Struktur oft nicht mehr einnehmen. Diese Aggregate müssen entweder wieder auf den richtigen Faltungsweg gebracht oder proteolytisch degradiert werden (Hilt und Wolf, 1996; Baumeister *et al.*, 1998).

Um den Faltungsprozess fehlerfrei und effizient ablaufen zu lassen, besitzen biologische Systeme Faltungshelfer (Gething und Sambrook, 1992; Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Es sind prinzipiell zwei Klassen –Faltungskatalysatoren und molekulare Chaperone– dieser ubiquitären Proteine, die an der Faltung der Polypeptidkette in der Zelle beteiligt sind, bekannt. Es existieren Faltungskatalysatoren, die spezifische Isomerisierungs-Reaktionen, die sonst zum geschwindigkeitslimitierenden Schritt bei der Proteinfaltung werden können, beschleunigen. Die Katalyse von Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen wird in Eukaryoten durch Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI; Freedman, 1989; Gething und Sambrook, ; Rietsch und Beckwith, 1998), in Prokaryoten durch *Disulfide bond formation*-Proteine (Dsb; Bardwell *et al.*, 1991; Rietsch *et al.*, 1996; Bader *et al.*, 1998) bewerkstelligt. Einige dieser Proteine, wie z.B. DsbC aus *E.coli*, katalysieren speziell die Isomerisierung von Disulfidbrücken (Zapun *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 1997). Die Isomerisierung einer X-P-Peptidbindung (X= jede Aminosäure, P = Prolin) wird durch Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen) beschleunigt (Fischer *et al.*, 1984). Es sind drei hochkonservierte Klassen dieser Isomerasen bekannt: Cyclophiline, die durch Bindung an das Immunsuppressivum Cyclosporin A charakterisiert sind, FKBP, die sich als FK506 (ebenfalls ein Immunsuppressivum) bindende Proteine auszeichnen und Parvuline, die mit 92 Aminosäureresten die Gruppe der kleinsten PPIasen darstellt (Standaert *et al.*, 1990; Scholz *et al.*, 1997; Schiene und Fischer, 2000). Für einige *Disulfide bond formation*-Proteine (Dsb) und PPIasen wurde neben der Isomerase-Aktivität auch Aggregationshemmende-Aktivität gefunden (Zheng *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Bothmann und Pluckthun, 2000).

Molekulare Chaperone stabilisieren neusynthetisierte, ungefaltete oder partiell gefaltete Protein-Strukturen und verhindern die Bildung inadäquater intra- oder intermolekularer Interaktionen (Jaenicke, 1998; Netzer und Hartl, 1998). Die Aufgabe, die durch oft in Netzwerken agierende Chaperone bewältigt wird, besteht darin, in verschiedenen Stufen der Proteinfaltung unterstützend einzugreifen. Zur Bewältigung der Faltung von Proteinen verschiedener Größen benötigt die Zelle oft komplexe zelluläre Reihen unterschiedlicher Chaperone und damit verbunden meistens metabolische Energie. Wie bereits erwähnt, weisen ungefaltete Proteine oft exponierte hydrophobe Bereiche auf. Viele Chaperone binden speziell solche hydrophoben, im nativen Protein verborgene Segmente und können dadurch un- und fehlgefaltete von korrekt gefalteten Proteinen unterscheiden. Die Bindung von Faltungsintermediaten verläuft dabei oft über Zyklen von Substratbindung und -Freisetzung, bei denen Energie in Form von ATP und Kofaktor-Proteine nötig sind. Generell sind zwei große Klassen dieser Faltungshelfer zu unterscheiden, die unter thermalen Streßbedingungen induziert werden und demnach auch als

Hitzeschock-Proteine (Hsp) bezeichnet werden. Zum einen wurden Hsp70 (z.B. DnaK in *E.coli*) zum anderen Hsp60 (z.B. GroEL in *E.coli*), das auch als Chaperonin bezeichnet wird, in eukaryotischen und prokaryotischen Systemen gefunden (Hendrick und Hartl, 1995; Hartl, 1996; Bukau und Horwich, 1998). Chaperonins zeichnen sich durch einen Hohlraum aus, in dem ganze Proteine von der Umgebung abgeschirmt falten können (Roseman *et al.*, 1996; Ranson *et al.*, 1998; Laufen *et al.*, 1999; Teter und Klionsky, 1999). Die meisten Chaperone werden konstitutiv exprimiert, wobei ihre Synthese unter Stress-Bedingungen wie erhöhte Temperatur, pH-Änderungen, Metalle, Lösungsmittel oder ein verändertes Redoxpotential deutlich gesteigert ist. Zur Wahrnehmung zellulärer Streßsignale werden Streßzustände, die zur Akkumulation von Proteinaggregaten führen können, mittels verschiedener Signaltransduktionskaskaden, an denen auch Chaperone beteiligt sein können, registriert (McMillan *et al.*, 1994). Die Mehrheit der Chaperone wurde bislang im Cytoplasma lokalisiert, jedoch beherbergen auch andere Zell-Kompartimente diese Proteine.

1.3 Faltungshelfer im Periplasma

Gram-negative Bakterien besitzen zusätzlich zur inneren Membran, die das Cytoplasma umgibt, eine äußere Membran, welche das zweite Kompartiment, das zwischen der inneren und äußeren Membran lokalisierte Periplasma, begrenzt. Im Periplasma Gram-negativer Bakterien wie *E.coli* herrschen andere Bedingungen als im gepufferten, energiereichen Cytoplasma, da durch Poren in der äußeren Membran ein direkter Kontakt mit der externen Umgebung besteht (Wülfing und Plückthun, 1994). So werden z.B. kleine Moleküle und einige Substrate stetig mit dem äußeren Medium ausgetauscht, wodurch das periplasmatische Milieu (Redoxpotential, pH, Lösungsmittel und toxische Substanzen) wenig konstant ist (Nikaido, 1994). Diese fluktuierenden Bedingungen im Periplasma stellen an periplasmatische Chaperone, deren Wirkmechanismen bislang wenig verstanden sind, besondere Ansprüche. Ein gravierender Unterschied zum Cytoplasma ist das Fehlen bekannter Energieträger im Periplasma, so dass andere Mechanismen als die aus dem Cytoplasma bekannten durch ATP katalysierten Zyklen von Substratbindung und -Freisetzung, zu erwarten sind. Die einzigen bezüglich Funktion bereits relativ gut untersuchten periplasmatischen Chaperone sind die auf die Pilus-Biogenese spezialisierten PapD-ähnlichen Faltungshelfer (Sauer *et al.*, 1999; 2000; Zavialov *et al.*, 2003).

Das periplasmatische Chaperon Skp (OmpH) ist an der Reifung von *outer membrane proteins* (OMPs) beteiligt (Chen und Henning, 1996; Missiakas *et al.*, 1996; Hayhurst und Harris, 1999; Schäfer *et al.*, 1999; Walton und Sousa, 2004). Neben diesen periplasmatischen Chaperonen ist noch eine Reihe von Faltungskatalysatoren bekannt, die im Periplasma möglicherweise zum beschleunigten Ablauf des Faltungsprozesses beitragen. Es sind soweit sechs Vertreter der Dsb-Proteine (Rietsch *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1997; Missiakas und Raina, 1997; Alba *et al.*, 2001) sowie Mitglieder aller drei PPIase-Familien im Periplasma gefunden worden. Das Protein PpiA

gehört zu den Cyclophilinen (Liu und Walsh, 1990; Hayano *et al.*, 1991; Howard *et al.*, 2003), FkpA zu den FKBP's (Horne und Young, 1995; Missiakas *et al.*, 1996; Ramm und Plückthun, 2001) und PpiD und SurA zu den Parvulin-ähnlichen PPIasen (Missiakas *et al.*, 1996; Rouvière und Gross, 1996; Dartigalongue und Raina, 1998). Für FkpA (Ramm und Plückthun, 2000; Arie *et al.*, 2001) und SurA (Rouvière und Gross, 1996; Behrens *et al.*, 2001) wurde zusätzlich zur PPIase Funktion auch eine Chaperon-artige Aktivität gefunden.

1.4 Signaltransduktionswege zur Streßwahrnehmung

Zur Wahrnehmung von extracytoplasmatischem Stress und zur Kontrolle der Faltungsaktivitäten im Periplasma sind drei Signaltransduktionswege, der σ^E , Cpx und Bae bekannt (Missiakas und Raina, 1998; Raffa und Raivio, 2002). Dabei wird die Information zwischen dem extracytoplasmatischen Raum und der cytoplasmatischen Genexpressionsmaschienerie über verschiedene Mechanismen übertragen. Die σ^E -Stressantwort wird durch un- oder fehlgefaltete *outer membrane proteins* (OMP) über die Inaktivierung des membran-lokalierten anti-Sigma-Faktors RseA induziert (1997b; De Las Penas *et al.*, 1997a; 2001; Alba *et al.*, 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass Peptide, die Aminosäuresequenzen ähnlich dem C-Termini (YYF-COOH und YQF-COOH) von OMP enthalten, von der C-terminalen PDZ-Domäne der periplasmatischen Protease DegS gebunden werden. PDZ-Domänen kommen in einer Reihe verschiedener Proteine vor und sind speziell für die Bindung an C-terminale Peptide bekannt (Doyle *et al.*, 1996; Fanning und Anderson, 1996). Das durch die Bindung C-terminaler Peptide von OMPs aktivierte DegS verursacht die Spaltung von RseA und es kommt zur Freisetzung des von RseA gebundenen σ^E -Faktors in das Cytoplasma (Walsh *et al.*, 2003). Dieser wiederum bindet an die RNA-Polymerase und führt zur Aktivierung der Transkription des σ^E -Regulons, wodurch eine Reihe verschiedener Gene exprimiert werden, deren Produkte an dem Abbau akkumulierter Faltungsintermediate beteiligt sind (Raffa und Raivio, 2002; Walsh *et al.*, 2003). Null-Mutationen von σ^E , kodiert durch *rpoE*, sind letal, wodurch man auf eine Beteiligung des Signalweges an essentiellen zellulären Funktionen schließen kann (De Las Penas *et al.*, 1997a).

Der Cpx-Signaltransduktionsweg wird durch Überproduktion verschiedener extracytoplasmatischer Proteine, durch alkalischen pH und *dsbD* Null-Mutationen induziert (Danese *et al.*, 1998; Otto und Silhavy, 2002). Die membranständige Sensor-Kinase CpxA, der cytoplasmatische Regulator CpxR und das periplasmatische Inhibitor-Molekül CpxP sind nach bisherigen Befunden die Komponenten dieses Systems (Raffa und Raivio, 2002). Bei den erwähnten Streßbedingungen wird zunächst CpxR durch CpxA mittels Phosphorylierung aktiviert. CpxR~P bindet anschließend an bestimmte Bereiche der Promotoren, unter deren Kontrolle eine Reihe von Genen, wie z.B. die für DsbA, PpiA, PpiD und DegP stehen (Snyder *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Raffa und Raivio, 2002). Die Regulons der Cpx- und σ^E -Systeme überlappen teilweise und beherbergen neben den erwähnten weitere Gene für periplasmatische

Chaperone und Proteasen (Connolly *et al.*, 1997).

Die vermuteten Bestandteile des zwei-Komponenten Bae-Systems sind BaeS, eine Sensor-Kinase, und der BaeR Regulator, der die *mdtABCD*-Expression kontrolliert. Die Produkte dieser Gene sind Bestandteile von *multidrug efflux pumps* (Baranova und Nikaido, 2002). Die bislang experimentell gefunden Auslöser für die Stress-Signale sind eine Vielzahl von Stressbedingungen der Zellhülle (Raffa und Raivio, 2002).

1.5 Proteine der äußeren Membran

Während die äußere Membran Gram-negativer Bakterien asymmetrisch aufgebaut ist, besteht die innere Membran ausschließlich aus Phospholipiden, zum überwiegenden Teil aus Phosphatidylethanolamin (Koebnik *et al.*, 2000). Die innere Schicht der äußeren Membran ist aus Phospholipiden, der äußere Teil aus Lipopolysacchariden (LPS) zusammengesetzt (Laird *et al.*, 1994). Die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien wie *E.coli* zeichnet sich durch eine Reihe unterschiedlicher Proteine aus, die u.a. zur ihrer Stabilität, Barrierefunktion und Permeabilität beitragen (Nikaido, 1985; Nikaido und Vaara, 1985; Nikaido, 1994). Etwa die Hälfte der Membran-Masse wird durch Proteine gestellt (Koebnik *et al.*, 2000). Die Resistenz Gram-negativer Bakterien gegen eine Vielzahl für die Zelle schädlicher Substanzen wie Antibiotika wird nicht nur durch die Barrierefunktion der äußeren Membran, sondern auch durch ein System aus *multidrug efflux pumps* gewährleistet (Nikaido, 1996). Es sind Transportmechanismen bekannt, durch die vermutlich reversibel diverse Moleküle in einem Kanal direkt vom externen Medium über die äußere und innere Membran ins Cytoplasma befördert werden (Nikaido, 1996; Koronakis *et al.*, 2000). Dabei wird das Periplasma durch einen die äußere und innere Membran verbindenden Kanal überwunden, so dass die transportierten Substanzen nicht mit dem periplasmatischen Kompartiment in Kontakt treten (Koronakis *et al.*, 2000). Als Beispiel für solch einen Kanal ist TolC (Morona *et al.*, 1983) zu nennen, welches eine Länge von 140 Å aufweist und aus einem α -helikalen und β -barrel Bereich aufgebaut ist (Koronakis *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2003).

Die äußere Membran wirkt prinzipiell wie ein molekulares Sieb, das nur bestimmte Moleküle ins Periplasma gelangen lässt. Für diesen Siebeffekt ist eine Reihe von integralen, Poren-bildenden Proteinen in der äußeren Membran verantwortlich. Diese Porine zeichnen sich durch eine erstaunliche Resistenz gegen denaturierende Agenzien und Proteasen aus (Schulz, 1993; Conlan *et al.*, 2000), was vermutlich in ihrer antiparallelen β -barrel Struktur begründet ist. Porine, durch die klassischen homotrimeren Vertreter PhoE, OmpF und OmpC repräsentiert (Nikaido, 1994), sind Wasser-gefüllte, Kanal-artige Proteine, welche mit der β -barrel Struktur die äußere Membran durchspannen (Bauer *et al.*, 1988; Cowan *et al.*, 1992; Van Gelder *et al.*, 1994; Schirmer, 1998; O'Keefe *et al.*, 2000). Für die Funktion des Proteins ist oft die Anordnung und Zusammensetzung der die β -Stränge verbindenden *loops* verantwortlich, wie es bei PhoE und

OmpF beobachtet wurde (Tommassen *et al.*, 1985; Agterberg *et al.*, 1989; Phale *et al.*, 1998). Man unterscheidet, je nach Funktion, spezifische und unspezifische Porine. Letztere bilden im Allgemeinen *barrels* aus 16 β -Strängen, durch die Moleküle bis ca. 600 Mr, ins Periplasma diffundieren können (Buchanan, 1999). Dabei wird durch den Durchmesser der Pore, welcher meistens durch in die Pore inserierende *loops* bestimmt wird, die Größe der zu transportierenden Moleküle festgelegt (Nikaido, 1992; Saint *et al.*, 1996). Im einfachsten Fall gelangen Moleküle entlang eines Konzentrationsgradienten durch diese passiven Poren über die äußere Membran ins Periplasma. Als Beispiele für den Molekül-Transport durch spezifische Diffusion, sind die aus einem 18 β -Strängen umfassenden *barrel* bestehenden Proteine (Buchanan, 1999) wie das Malto-Porin LamB (Schirmer *et al.*, 1995; Charbit *et al.*, 2000), das Sucrose-Porin ScrY (Schulein *et al.*, 1991) und das Nukleoside-transportierende Tsx zu nennen (Ranquin und Van Gelder, 2004).

Doch auch ein Transport gegen einen Konzentrationsgradienten kann durch spezifische Proteine bewerkstelligt werden (Hofnung, 1995). Die größten bekannten β -*barrel* Proteine der äußeren Membran sind FepA und FhuA (Buchanan, 1999). Durch aktiven Transport, ermöglicht über den Kontakt mit dem TonB und ExbBD Komplex an der inneren Membran (Usher *et al.*, 2001), werden von FepA und FhuA Eisen-Chelate aufgenommen. Es existieren jedoch auch andere integrale Außenmembranproteine, die keine Moleküle in diesem Ausmaß durch die äußere Membran schleusen. So sind noch viele weitere Proteine, wie das aus 10 antiparallelen β -Strängen bestehende β -*barrel* OmpT (Vandeputte-Rutten *et al.*, 2001), das genau wie OMPLA auch Proteaseaktivität aufweist (Dekker *et al.*, 1995; Buchanan, 1999), oder das zur Stabilität der äußeren Membran beitragende monomere OmpA zu nennen (Pautsch und Schulz, 1998). Letzteres wird, wie Untersuchungen zur Konduktivität und Konformation sowie Vergleiche mit den Homolog OprF aus *P. aeruginosa* nahe legen, zu den *slow porins* gezählt (Brinkman *et al.*, 2000; Nikaido, 2003). So liegt OmpA vermutlich in zwei Konformationen vor, eine „geschlossene“ Konformation mit einem aus acht β -Strängen bestehenden *barrel*, das selbst für kleine Moleküle praktisch unpassierbar ist, und eine „offene“ Konformation, bei der der C-terminale Bereich des Proteins, der bei der „geschlossenen“ Konformation im Periplasma lokalisiert ist, weitere β -Stränge zum *barrel* beiträgt, wodurch der Porendurchmesser vergrößert wird (Arora *et al.*, 2000; Nikaido, 2003). Die Mehrzahl der OmpA Moleküle liegt jedoch in der „geschlossenen“ Konformation vor. Unter den OMPs wurde auch ein potentieller Assemblierungs-Helfer, das Omp85 gefunden, das offensichtlich essentiell für das Überleben der Zelle ist (Voulhoux *et al.*, 2003)

Wie bei allen OMPs beträgt der Scher-Winkel, den die β -Stränge des *barrels* zur Lotrechten der äußeren Membran haben, etwa 45°. Im Bereich der Grenzfläche der äußeren Membran zum umgebenden Medium bilden die *barrels* in der Regel einen sogenannten *aromatic belt* aus (Schulz,

2000). Dieser Gürtel aus aromatischen Aminosäuren dient zur Aufrechterhaltung der Stabilität und zur Verankerung der Proteine in der hydrophoben Lipiddoppelschicht der äußeren Membran (Seshadri *et al.*, 1998). Anhand von drei Beispielen wird die Funktionweise und der Aufbau verschiedener OMPs erläutert.

1.6 Das Maltose-Bindeprotein LamB

Das homotrimere Maltose-Bindeprotein LamB (Abb. 2) wird bei Wachstum auf Maltose produziert (Cowan *et al.*, 1992; Van Gelder *et al.*, 2001). LamB dient der Aufnahme von Maltose und als Rezeptor für den Phagen λ (Morona *et al.*, 1985a; Lazar *et al.*, 1998). Das Monomer besteht aus 18 antiparallelen β -Strängen, die durch extrazelluläre *loops* und interne *turns* verbunden sind (Schirmer *et al.*, 1995; Dutzler *et al.*, 1996). Der Transport von Maltodextrinen durch die Pore von LamB wird neben dem *polar track* (Dumas *et al.*, 2000) durch die *greasy slide*, die aus sieben aromatischen Aminosäuren (Y41, Y118, Y6, W420, W358 und F227 sowie W74 des Nachbarmoleküls) entlang der Innenseite der Pore gebildet wird, bewerkstelligt (Van Gelder *et al.*, 2002). Von dem *polar track* ist bekannt, dass er durch konstantes Formieren und Auflösen von Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxyl-Gruppen des Zuckers und polaren Resten des *polar tracks*, die Wasserstoff-Donoren und Akzeptoren darstellen, eine Bewegung der Maltose durch den Kanal ermöglicht (Dumas *et al.*, 2000). Diese Bewegung ist somit durch die Fähigkeit des *polar tracks* zur Wasserstoffbrücken-Bildung zur Kompensierung für gebundene Wassermoleküle begründet (Ranquin und Van Gelder, 2004).

Die aromatischen Aminosäuren der *greasy slide*, die u.a. aus verschiedenen *loops* des Proteins und im Falle von Trp74 von einem Nachbarmolekül rekrutiert werden (Andersen *et al.*, 1999), interagieren über van der Waals Kontakte mit den hydrophoben Bereichen des Glykosyl-Ringes des Maltooligosaccharides und bewirken dadurch eine Ausrichtung des Zuckers längs zur Kanalachse (Van Gelder *et al.*, 2002). Das Zusammenspiel dieser beiden Mechanismen von polaren und hydrophoben Interaktionen ermöglicht vermutlich die für den spezifischen Transport der Maltose nötige Dehydratation und Hydratation des Zuckers (Van Gelder *et al.*, 2002).

Ein weiterer Faktor, der die Spezifität von LamB maßgeblich bestimmt, ist die Funktion von *loop 3*. Dieser ist im nativen Protein in die Pore eingefaltet und gibt dadurch den Durchmesser der Öffnung vor (Chan *et al.*, 1996). Der *loop 3* ist auch in bisher nicht vollständig verstandener Weise an der Assemblierung der Trimer-Untereinheiten beteiligt, da ein zusätzliches Tyr zwischen Tyr 118 und Tyr 119 einen Temperatur-sensitiven Defekt der Trimerisierung bewirkt. Zusätzlich hat diese Insertion in *loop 3* von LamB einen Defekt der Zucker-Bindung zur Folge (Misra *et al.*, 1991).

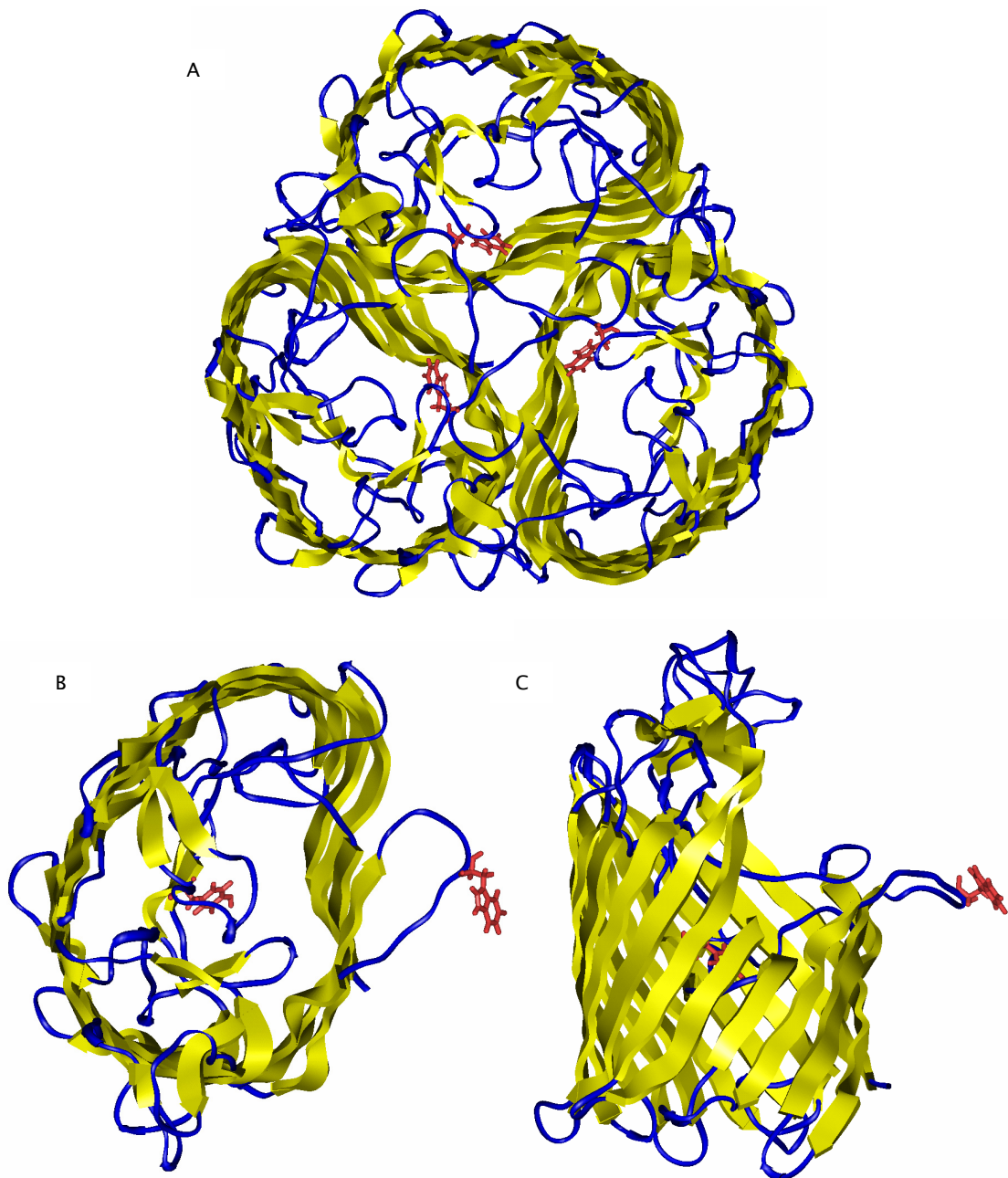


Abb. 2: Struktur (3.1 Å) von LamB aus *E.coli* (PDB-Nummer: 1MAL unter www.rcsb.org/pdb; Schirmer *et al.* 1999). Die loops und turns sind in blau, β -Stränge in gelb gehalten. (A) Aufsicht auf die externe Seite des trimeren LamB-Moleküls mit W74 in rot. (B) Aufsicht auf ein β -barrel-Monomer von LamB. In loop 2 ist W74, in loop 3 Y118 rot markiert. Beide aromatischen Aminosäuren sind Teil der greasy slide. (C) Seitenansicht eines monomeren β -barrel LamB-Moleküls mit dem in loop 2 markierten Rest W74. Der loop 2 klinkt in ein benachbartes β -barrel ein und dient dadurch im nativen Trimer zur Stabilisierung. Am unteren Ende des β -barrels sind die periplasmatischen turns, am oberen die externen loops dargestellt. Die Grafiken wurden mit *InsightII* erstellt.

1.7 Das *outer membrane protein F*

Das ebenfalls homotrimere „*outer membrane protein F*“ OmpF (Abb. 3) ist ein aus 16 β -Strängen bestehendes *barrel* und bildet pro Monomer einen Kanal, der die passive Diffusion von kleinen Molekülen bis zu 600 M_r erlaubt (Benz und Bauer, 1988; Cowan *et al.*, 1992 1995). Wie schon bei LamB beschrieben, faltet auch bei OmpF der *loop 3* etwa auf der Höhe des Zentrums der Membran in die Pore und gibt dadurch den Durchmesser und damit u.a. die molekulare Ausschlussgröße des Kanals vor (Phale *et al.*, 2001; Robertson und Tieleman, 2002). Die Deletion von *loop 3* in OmpF führt zwar zu einem erweiterten Kanal, verursacht aber keine Änderung der β -*barrel* Struktur oder Stabilität (Watanabe *et al.*, 1997). Im Allgemeinen scheint es, dass die *barrel* Struktur der OMPs ein recht robustes Grundgerüst darstellt, auf das die Funktions-ebenen *loops* und *turns* einen verhältnismäßig geringen strukturellen Einfluss ausüben.

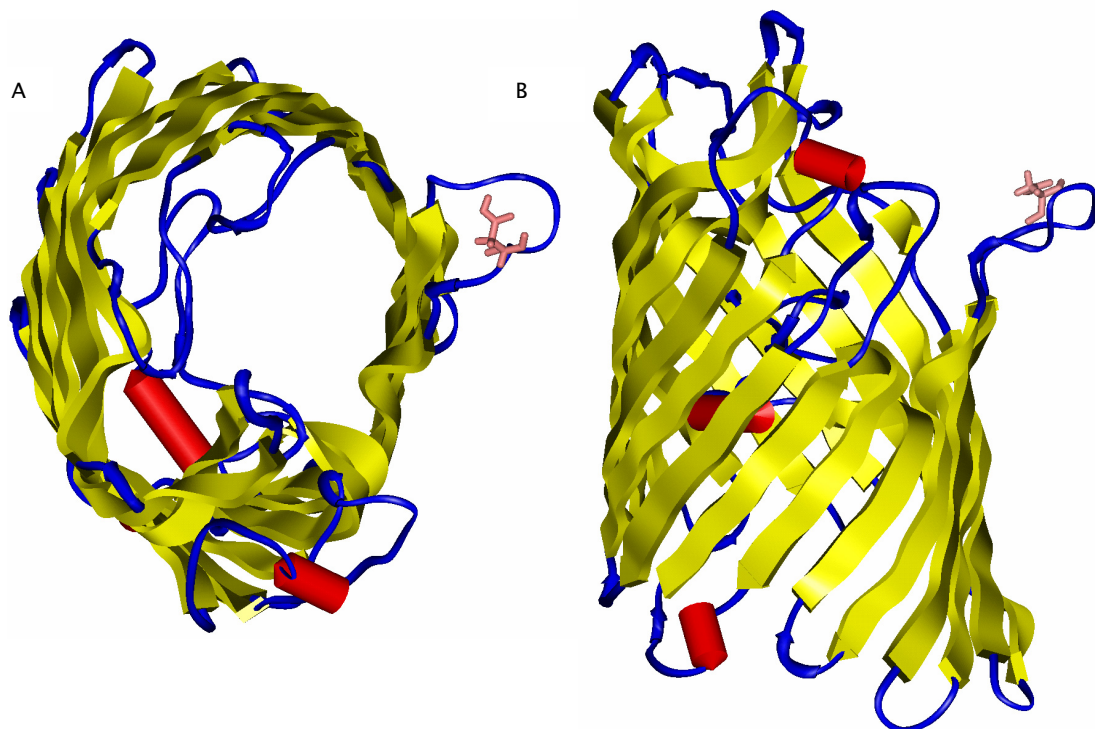


Abb. 3: Struktur von OmpF (3.5 Å) aus *E.coli* (PDB-Nummer: 2OMF unter www.rcsb.org/pdb; Cowan *et al.*, 1998). Die *loops* und *turns* sind in blau, β -Stränge in gelb und α -Helices in rot gehalten. (A) Aufsicht auf die externe Seite des monomeren OmpF-Moleküles mit dem in *loop 2* lokalisierten D74 in rot. (B) Seitenansicht eines monomeren β -*barrel* von OmpF mit dem in *loop 2* markierten Rest D74, der zur polaren Umgebung der benachbarten Pore beiträgt. Der *loop 2* klinkt in ein benachbartes β -*barrel* ein und dient dadurch im nativen Trimer zur Stabilisierung. Am unteren Ende des β -*barrels* sind die periplasmatischen *turns*, am oberen die externen *loops* dargestellt. Die Grafiken wurden mit *InsightII* erstellt.

Zur Verbindung und Stabilisierung des Trimers klappt *loop 2* des einen OmpF-Monomeres in den Kanal des nächsten Nachbarmoleküls (Phale *et al.*, 1998). Der *loop 2* wird über eine Salzbrücke zwischen einem Glutanyl-Rest und kationischen Gruppen der Kanalinnenseite

sowie über hydrophobe Interaktionen stabilisiert (Watanabe *et al.*, 1997). Die Kombination dieser Interaktionen erklärt die hohe Stabilität des Proteins. Entsprechend der Selektivität von OmpF für kleine geladene Moleküle, ist in dem *loop* 2 eine geladene Aminosäure, D74, vorhanden, die vermutlich einen Beitrag zur geladenen Innenseite der Pore liefert (Phale *et al.*, 2001). Interessanterweise ist bei dem sehr ähnlich aufgebauten LamB in *loop* 2 ein Trp in Position 74 zu finden, welches einen Beitrag zur *greasy slide* stellt.

Die Innenseite von OmpF ist an der engsten Stelle mit mehreren geladenen Resten ausgestattet, deren Beitrag zur Konduktivität der Pore entscheidend und pH abhängig ist (Todt und McGroarty, 1992; Saint *et al.*, 1996; Phale *et al.*, 2001). So stehen im Inneren des Kanals einer Phalanx von Argininen (R42, R82 und R132) mindestens zwei in *loop* 3 lokalisierte, negative Reste (D113 und E117) gegenüber (Lou *et al.*, 1996). Experimente zum Austausch dieser geladenen Aminosäuren und zur Deletion des internen *loops* (Δ 109-114) zeigten keine drastischen Änderungen der β -barrel Struktur, wie kristallographisch gezeigt wurde (Lou *et al.*, 1996). Es konnte jedoch bei substituierten oder deletierten negativ geladenen Aminosäuren im *loop* 3 (D113G, Δ 109-114) eine Reduktion der Kationen-Selektivität beobachtet werden. Der Austausch der positiven Ladungen (R42, R82 und R132) führt erwartungsgemäß zu einer verringerten Abstoßung von Kationen, was experimentell durch verstärkte Kationen-Selektivität bestätigt wurde (Saint *et al.*, 1996).

1.8 Das *outer membrane protein A*

Eine der kleinsten bekannten β -barrel Struktur der äußeren Membran stellt OmpA dar. Es kommt in der äußeren Membran sehr häufig vor und ist das am besten charakterisierte Mitglied der großen Familie homologer bakterieller OMPs. Die N-terminale Domäne dieses Proteins bildet, wie aus Abb. 4 ersichtlich, ein *barrel* aus 8 antiparallelen β -Strängen mit kurzen *turns* auf der periplasmatischen und langen *loops* auf der externen Seite (Pautsch und Schulz, 2000). Der C-terminale Bereich ist in der bereits erwähnten „geschlossenen“ Konformation am Peptidoglykan verankert (Koebnik, 1995; Koebnik *et al.*, 2000), während er vermutlich in der „offenen“ Konformation mit β -Strängen zu der Bildung des *barrels* beiträgt und somit die Passage für Moleküle durch die Pore zulässt. Im Gegensatz zu den klassischen Porinen, weist OmpA nur geringe Transportraten von Molekülen auf, wodurch es zu den *slow porins* gezählt wird (Pautsch und Schulz, 1998). Eine weitere wichtige Funktion dieses OMPs liegt in der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der äußeren Membran, da OmpA einen soliden transmembranen Anker darstellt und vermutlich ein physikalisches Zusammenhalten der äußeren Membran und der darunter liegenden Peptidoglykanschicht gewährleistet (Pautsch und Schulz, 1998; Koebnik *et al.*, 2000). Die extrazellulären *loops* des Proteins ermöglichen zudem die bakterielle Konjugation und erkennen spezifische Colicine und Bakteriophagen (Morona *et al.*, 1985b; Buchanan, 1999).

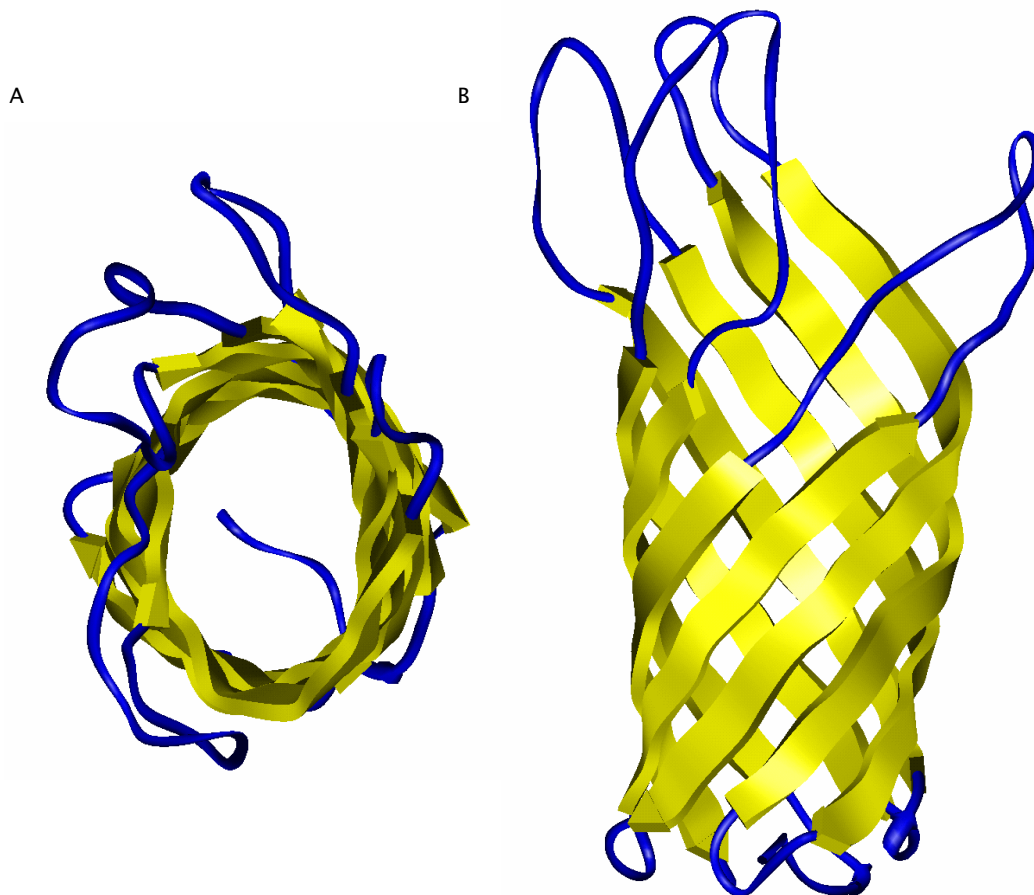


Abb. 4: Struktur (2.5 Å) der transmembranen Domäne (1-171) von OmpA aus *E.coli* (PDB-Nummer: 1BXW unter www.rcsb.org/pdb; Pautsch und Schulz, 1998). Die *loops* und *turns* sind in blau und β -Stränge in gelb gehalten. Die N-terminale Domäne von OmpA ist ein aus 8 antiparallelen β -Strängen bestehendes β -barrel. (A) Aufsicht auf die externe Seite des monomeren OmpA-Moleüles. (B) Seitenansicht eines monomeren β -barrel von OmpA. Am unteren Ende des β -barrels sind die periplasmatischen *turns*, am oberen die externen *loops* dargestellt. Die Grafiken wurden mit *InsightII* erstellt.

1.9 Zur Biogenese der *outer membrane proteins*

1.9.1 Die Reifung von OMPs wird durch Faltungshelfer unterstützt

Die OMPs, die als Polypeptidkette mit einer speziellen Signalsequenz versehen durch die SecY-Translokations-Maschinerie über die Cytoplasma-Membran transportiert werden (Bernstein, 2000; Manting *et al.*, 2000), müssen unter extracytoplasmatischen Bedingungen ihre native Struktur einnehmen und jene unter ihnen, die in der äußeren Membran Trimere bilden, zusätzlich noch kontrolliert trimerisieren. Für OmpF nimmt man beispielsweise an, dass nach dem Transport über die innere Membran ein lösliches, monomeres Protein vorliegt, welches im Periplasma oder in der äußeren Membran die native trimere Form annimmt (Sen und Nikaido, 1990). Bei dieser Assemblierung der Trimere OmpF und LamB scheinen auch Lipopolysaccharide (LPS) eine Rolle zu spielen, wie aus Studien mit LPS-defekten Zellen

hervorgeht (Laird *et al.*, 1994). Studien zur Assemblierung von OmpF haben auch gezeigt, dass das Protein durch Mutationen von W214 zu E oder Q und Y231 zu Q die Fähigkeit zur korrekten Trimerisierung der monomeren Untereinheiten verliert (Misra, 1993). Die Faltung und Insertion des OMPs OmpA in eine Lipiddoppelschicht ist intensiv untersucht worden. In verschiedenen Studien wurde eine stufenweise Faltung und Insertion in Lipiddoppelschichten beobachtet, die allerdings relativ langsam, in zeitlichen Größenordnungen von Minuten bis Stunden, von statten geht (Surrey und Jahnig, 1995; Kleinschmidt und Tamm, 1996; Surrey *et al.*, 1996). Es werden dabei drei Membran-gebundene Faltungsintermediate für OmpA angenommen: (I) ein größtenteils unstrukturierter Komplex, (II) eine aus einzelnen oder möglicherweise gepaarten β -Strängen bestehende *molten disk*, die sich an die Membran anlagert und (III) ein *molten globule* Zustand, bei dem OmpA bereits weiter in die Membran eingedrungen ist (Kleinschmidt *et al.*, 1999; Kleinschmidt und Tamm, 1999; Tamm *et al.*, 2001).

Die Biogenese der OMPs ist bislang noch nicht vollständig verstanden, es konnte jedoch eine Beteiligung der periplasmatischen Proteine Skp (De Cock *et al.*, 1999; Schäfer *et al.*, 1999) und SurA (Lazar und Kolter, 1996; Rouvière und Gross, 1996; Behrens *et al.*, 2001) an der Faltung der OMPs beobachtet werden. Für das Monomer OmpA wurde *in vitro* eine beschleunigte Faltung und Insertion in die äußere Membran in Anwesenheit von Lipopolysacchariden (LPS) und Skp gezeigt (De Cock *et al.*, 1999; Bulieris *et al.*, 2003). Weiterhin konnte eine Lokalisierung des PhoE-Skp Komplexes an der periplasmatischen Seite der inneren Membran gezeigt werden (Schäfer *et al.*, 1999; Harms *et al.*, 2001). Zusätzlich zu den bisherigen Hinweisen deutet der Befund, dass *skp*-Mutanten eine reduzierte Anzahl verschiedener OMPs in der äußeren Membran und erhöhte σ^E -Aktivität aufweisen, auf einen durch Skp-assistierten Faltungsweg für OMPs hin (Chen und Henning, 1996; Schäfer *et al.*, 1999). Das ursprünglich als PPIase identifizierte SurA-Protein spielt ebenfalls bei der Reifung der Proteine der äußeren Membran eine zentrale Rolle. Das Fehlen von SurA führt zu ähnlichen, aber wesentlich stärker ausgeprägten Phänotypen als das Fehlen von Skp. Die Deletion von *skp* und *surA* führt zu einem synthetischen letalen Phänotyp (Lazar und Kolter, 1996; Rouvière und Gross, 1996; Rizzitello *et al.*).

1.9.2 Die PPIase SurA als Faltungshelfer im Periplasma

Die periplasmatische Peptidyl-Prolyl-Isomerase SurA (M_r 48.000) aus *Escherichia coli* ist für das Überleben (*survival*) in der stationären Wachstumsphase notwendig (Tormo *et al.*, 1990). Eingehende Untersuchungen von *surA*-Mutanten ergaben, dass SurA in die Reifung von OMPs involviert ist und zusätzlich zur PPIase- auch Chaperon-ähnliche -Aktivität besitzt (Rouvière und Gross, 1996; Lazar *et al.*, 1998; Behrens *et al.*, 2001). So ist bei SurA defizienten *E.coli* Zellen eine gestörte Biogenese der OMPs und folglich eine destabilisierte äußere Membran, verursacht durch eine verringerte Konzentration der trimeren OMPs OmpC, OmpF und LamB sowie des

monomeren OmpA, beobachtet worden (Rouvière und Gross, 1996). Die *surA* Zellen sind durch die daraus resultierende defekte Zellhülle sehr sensitiv für hydrophobe Detergenzien wie SDS oder EDTA sowie Antibiotika und weisen eine konstitutiv erhöhte σ^E -Aktivität und bei erhöhtem pH (pH 9) einen letalen Phänotyp auf (Missiakas *et al.*, 1996; Rouvière und Gross, 1996; Lazar *et al.*, 1998).

Am Beispiel des trimeren Maltoproteins und Phagenrezeptors LamB wurde eine Beteiligung von SurA an der Konversion von ungefalteten zu gefalteten LamB-Monomeren beobachtet (Rouvière und Gross, 1996). In Abb. 5 wird der postulierte Verlauf der LamB-Biogenese gezeigt und verdeutlicht, dass SurA demnach in einen recht frühen Schritt dieses Prozesses involviert ist. In Abwesenheit von SurA und bei Überexpression von LamB in Anwesenheit von SurA wurde eine Akkumulation ungefalteter Monomere beobachtet.

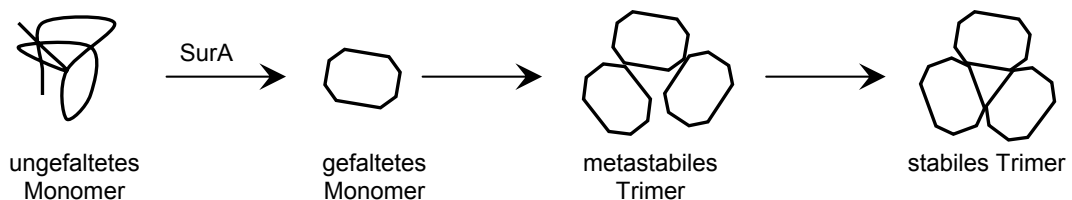


Abb. 5: Modell zur LamB-Biogenese (nach Rouvière und Gross, 1996).

SurA ist aus vier Segmenten, der N-terminalen Region, den Parvulin-ähnlichen Domänen I und II und einem C-terminalen Teil aufgebaut (Abb. 6). In der carboxyterminalen Hälfte sind zwei Parvulin-ähnliche Domänen (Rahfeld *et al.*, 1994), die von den N- und C-terminalen Abschnitten flankiert sind, vorhanden. Diese flankierenden Segmente besitzen keine signifikante Ähnlichkeit zu bisher bekannten Proteinen. Die Parvulin-ähnlichen Domänen zeigen u.a. Sequenzhomologien zu EssI aus Hefe und humanem Pin1, beides Parvuline mit essentieller Peptidyl-Prolyl-Isomerase Aktivität (Hani *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1996). In einem Proteasegekoppelten PPIase-*assay*, bei dem kurze Tetrapeptide als Substrat verwendet werden, konnte *in vitro* eine cis \rightarrow trans Konversion von Peptidyl-Prolyl Bindungen durch die PPIase-Aktivität der PII-Domäne, jedoch nicht durch die der PI-Domäne gezeigt werden (Rouvière und Gross, 1996).

Allerdings ist auch die Funktion der PPIase Domäne II für die Chaperon-ähnliche Aktivität nicht essentiell, wie Untersuchungen an SurA-Varianten ohne PII-Domäne gezeigt haben (Behrens *et al.*, 2001). Es wurde *in vivo* nachgewiesen, dass die SurA-Variante SurANcT, ohne die Parvulin-ähnliche Domänen PI und PII, den *surA*-Phänotyp fast vollständig komplementiert (Behrens *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde in der gleichen Studie beobachtet, dass SurA präferentiell mit *in vitro* synthetisierten ungefalteten OMPs (LamB, PhoE und OmpF) interagiert, was sich mit Erkenntnissen aus anderen SurA-Bindungsexperimenten mit ungefalteten OmpF und OmpG deckt (Bitto und McKay, 2004).



Abb. 6: Schema des modularen Aufbaus von SurA. Die einzelnen Segmente: Signal-Sequenz in weiß, N-terminaler Teil blau, PPIase Domäne 1 in grün, PPIase Domäne 2 gelb, C-terminaler Teil in rot. Die Nummern der Aminosäurereste kennzeichnen den Anfang des jeweiligen Segmentes.

Bindungsstudien zeigten ferner, dass nur der N-terminale Bereich für die Bindung ausreichend ist (Webb *et al.*, 2001). Es wurde bei diesem Experiment der N-Terminus nicht in Verbindung mit der C-terminalen Helix, die vermutlich zur Stabilisierung des N-Terminus dient (Behrens *et al.*, 2001), verwendet, so dass man auf eine Bindungsstelle für das verwendete Peptid im N-terminalen Bereich schließen kann. Bitto und McKay (2003, 2004) haben in *phage-display* Experimenten mit einer Heptamer-Peptid-Bibliothek eine Präferenz von SurA für bestimmte Aminosäure-Sequenzen beobachtet. Es wurde in SurA-bindenden Peptiden, deren Interaktion mit SurA eine Gleichgewichtskonstante (K_D) von 1-14 μM aufwies, die Sequenz Ar-polar-Ar-unpolar-P (Ar = F, W oder Y; P = Prolin; x = jede Aminosäure) gefunden. Daher wurde postuliert, dass SurA spezifisch *outer membrane protein* Polypeptide erkennt, da das Ar-x-Ar Motiv bevorzugt in OMPs zu finden ist (Bitto und McKay, 2004).

Die bisherigen biochemischen und genetischen Studien zeigen somit, dass eine Chaperon-ähnliche Funktion, welche bei der Reifung von OMPs eine Rolle spielt, allein durch die N-terminale Region in Verbindung mit dem C-Terminus gegeben ist. Zudem enthält der N-terminale Bereich noch eine Peptidbindestelle (Webb *et al.*, 2001), von der nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese auch Ort der Chaperon-ähnlichen Aktivität ist. Die kürzliche Aufklärung der Struktur liefert einen Hinweis für diesen Sachverhalt, da sich der N- und C-terminale Bereich zusammen mit der PI-Domäne zu einem *core* Modul zusammenlagert (Bitto und McKay, 2002). In Abb. 7 ist die Kristallstruktur von SurA, das demnach die Form einer assymetrischen „Hantel“ besitzt, gezeigt. Die vom *core* distale Domäne, die Parvulin-ähnliche Domäne II, ist etwa 30 Å vom *core* entfernt und weist sowohl sequentielle als auch strukturelle Homologien zum humanen Pin1 auf. Dabei ist die Sequenzidentität zwischen PinI und der PII-Domäne (36 %) höher als die von PinI und der PI-Domäne (23 %). Zwei für die PPIase-Funktion notwendige, hoch konservierte Aminosäurereste der PII-Domäne sind His376, das vermutlich Teil des aktiven Zentrums ist, und Ile 378, da deren Substitution gegen Ala zum Aktivitätsverlust der PII-Domäne führt (Behrens *et al.*, 2001). Die inaktive Parvulin-ähnliche Domäne PI ist Teil des *cores* und liegt „Huckepack“ am Rücken des aus N- und C-Terminus bestehenden NCT-Bereiches. Eine von Bitto und McKay (2002) vorgenommene Superimposition der PinI mit der PI- und PII Domäne von SurA ergab, dass die Struktur der PII-Domäne besser mit der von PinI übereinstimmt als die Struktur der PI-Domäne.

Es sind drei Positionen in der PI-Domäne vorhanden, die von den vergleichbaren Positionen in PinI und in der PII-Domäne abweichen. (1) Ein *loop* (Aminosäurereste 184-191) im Anschluß an den ersten β -Strand der PI-Domäne ist länger als der korrespondierende *loop* der PII-Domäne (Aminosäurereste 295-299).

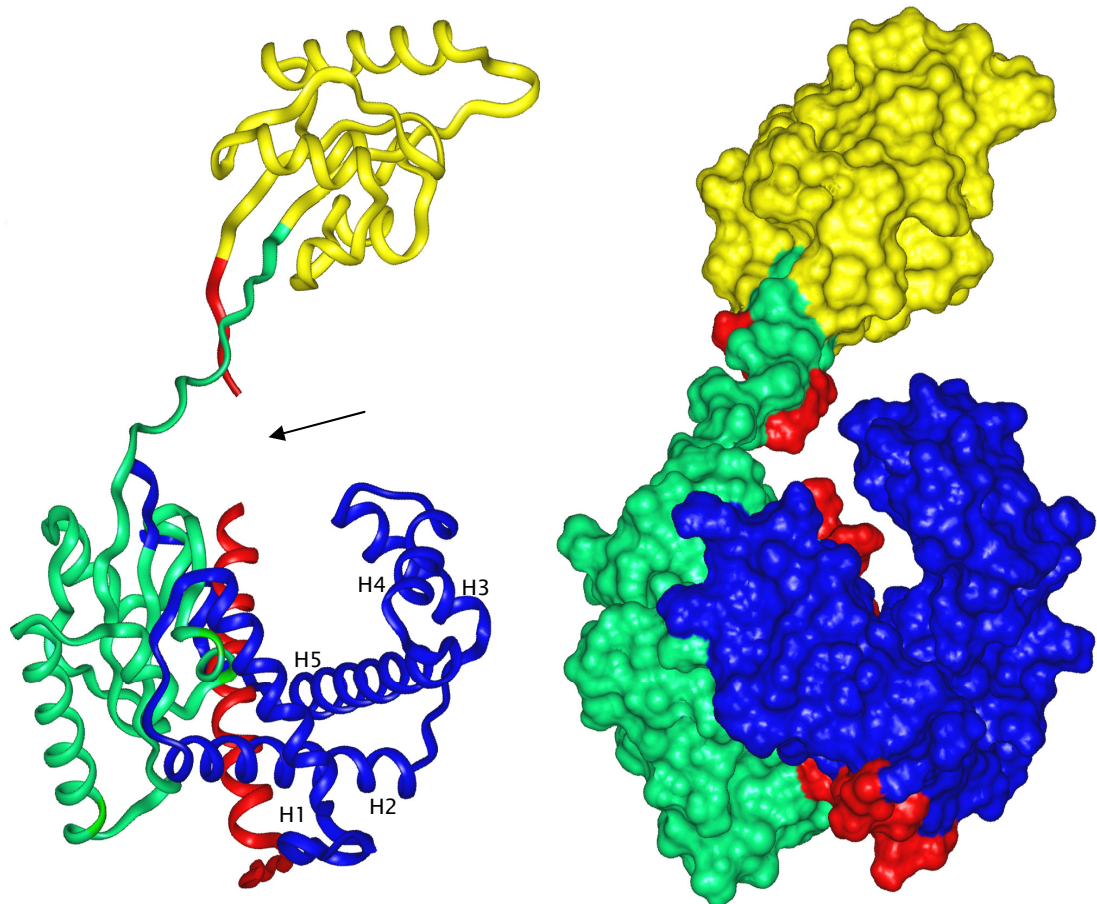


Abb. 7: Kristallstruktur von SurA aus *E.coli*, 3.0 Å (PDB-Nummer: 1M5Y unter www.rcsb.org/pdb, Bitto & McKay, 2002). (A) links: Darstellung mit vereinfachter Sekundärstruktur, Helices durch H1–H5 markiert, (B) rechts mit Oberflächenstruktur. Der Pfeil zeigt den Verbindungsbereich zwischen PII-Domäne und *core*, der relativ flexibel ist und in der Struktur nicht aufgelöst wurde. Die einzelnen Bereiche: N-terminaler Bereich blau, PPIase-Domäne I grün, PPIase-Domäne II gelb, C-terminaler Teil rot. Die Bilder wurden mit *InsightII* erzeugt.

Das PinI-Molekül weist an der entsprechenden Position (Aminosäurereste 65-81) ein verlängertes Peptidsegment auf, welches Liganden für eine Phosphat-Bindung in der Nähe des aktiven Zentrums bereitstellt. (2) Die zu Position Thr319 in der PII-Domäne und Position Glu101 in PinI korrespondierende Aminosäure in der PI-Domäne ist deletiert. Jedoch liegt diese Position vom aktiven Zentrum entfernt, so dass die Aktivität hierdurch vermutlich unbeeinflusst bleibt. (3) Die Insertion eines einzelnen Aminosäurerestes (Gly333) in der PII-Domäne, der das aktive Zentrum begrenzt, ist weder in der PI-Domäne noch in PinI beobachtet worden. Zudem ist die PI-Domäne von SurA durch verschiedene Interaktionen mit der C-Terminalen α -Helix konformationell verzerrt und der Zugang zum katalytischen Spalt teilweise eingeschränkt.

Daraus ließe sich die fehlende PPIase-Aktivität der PI-Domäne erklären. Allerdings ist die PI-Domäne allein, ohne die sterischen Behinderungen auch nicht aktiv (Behrens *et al.*, 2001), so dass hier vermutlich noch andere Faktoren zum Verlust der Aktivität führen.

Die Struktur zeigt ferner, dass im *core* von SurA eine Spalte, gebildet aus den Helices 1-5 des N-Terminus und der C-terminalen Helix vorhanden ist. Diese Spalte beherbergt im Kristall die Helix 6 eines benachbarten SurA-Moleküls (Bitto und McKay, 2002). Zur Stabilisierung der Bindung zwischen der Spalte und Helix 6 trägt eine hydrophobe Tasche bei, die an der Innenseite des die Spalte begrenzenden Flügels lokalisiert ist. Die Aminosäure Leu 153 der Helix 6 wird von dieser Tasche gebunden. Die Spalte von SurA ist somit eine potentielle Substratbindestelle, da die Größe und Form der Spalte für eine Interaktion mit einer Polypeptidkette sehr gut geeignet zu sein scheint. Da bisher weder strukturelle noch biochemische Befunde zur Funktion von SurA eine bekannte Energiequelle als treibende Kraft für die Chaperon-artige Aktivität ausmachen konnten, stellt sich die Frage nach einem molekularen Mechanismus seiner Chaperon-Aktivität.

1. 10 Zielsetzung

Aus den vorliegenden Erkenntnissen zur SurA-vermittelten Faltung von OMPs im Periplasma von *E. coli* ergaben sich weitere Fragestellungen bezüglich der Funktionsmechanismen von SurA. In dieser Arbeit soll die molekulare Basis der Interaktion zwischen SurA und seinen Substraten untersucht werden. Zur Ermittlung der Substratspezifität von SurA sollen Zellulose-gebundene Peptidbibliotheken (13mere), die die Primärsequenz der natürlichen Substrate LamB, OmpF und das Kandidaten-Substrat OmpA repräsentieren, mit SurA und SurAN+ICt (ohne die PII-Domäne) auf Bindung durchmustert werden. SurA-bindende Peptide sollen gegebenenfalls mittels SPR- und Fluoreszenz-Spektroskopie bezüglich der Interaktion mit SurA auf Spezifität und Affinität untersucht werden. Zudem könnten Peptide, die von SurA spezifisch erkannt werden, Aufschluß über die Lage der Bindestellen für SurA in der nativen Struktur der Substrate geben.

Desweiteren soll die für Chaperonfunktion relevante Substratbindestelle in SurA durch EPR-Spektroskopie lokalisiert werden. Hierzu sollen zunächst in bestimmten Positionen der N- und C-terminalen Regionen von SurA einzelne ausgewählte Aminosäuren gezielt gegen Cystein ausgetauscht und diese singulären Cysteine anschließend mit der Radikalsonde MTSSL markiert werden (*site directed spin labeling*). SurA-Cys-Proteine sollen dann in An- und Abwesenheit zuvor identifizierter SurA-bindender Peptide EPR-spektroskopisch vermessen werden. Charakteristische Veränderungen des EPR-Signals in Anwesenheit eines Peptides lassen auf eine Bindung oder konformationelle Änderung schließen.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

Escherichia coli

CAG44102 (Behrens *et al.*, 2001)

MC4100 *surA::Tn10dCm slyD1 λ hg::Tn10* ; Cm^R, Tc^R

BMH71-18 (Quelle: B. Müller-Hill)

[F⁺ *lacIq lacZΔM15, proA⁺B⁺; Δ(lac-proAB)supE, thi*]

2.2. Plasmide

2.2.1 pASKSurA und abgeleitete Konstrukte

Die zur Klonierung und Expression von SurA als Ausgangsvektoren verwendeten Plasmide pASKSurA (Abb. 8) und davon abgeleitete Konstrukte basieren auf dem Vektor pASK75, der neben dem Gen für β -Laktamase, deren Produkt Resistenz gegen Ampicillin vermittelt, einen regulierbaren Tetrazyklin Promotor mit zwei Ribosomenbindestellen besitzt, die eine effiziente Initiation der Transkription gewährleisten (Skerra, 1994; Behrens *et al.*, 2001). In Transkriptionsrichtung 3' hinter *surA* liegt die kodierende Sequenz für das Oligohistidin. Letzteres kann zur Reinigung der SurAHis6 Fusion über Nickel-Affinitätschromatographie verwendet werden.

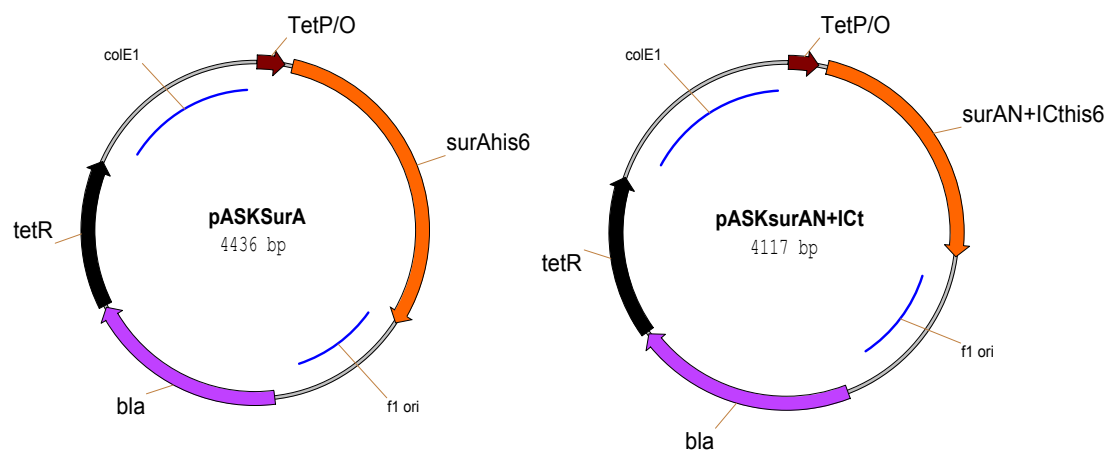


Abb. 8: Genetische Karte des Vektors pASKSurA und pASKsurAN+ICt. Die Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an: *surA*, *surAN+ICt* und *surANct* sind kodierende Bereiche für SurA-Varianten; *tetP/O*: Tc Promotor/Operator Region; *f1*: Replikationsursprung des filamentösen Phagen *f1*; *tetR*: kodierender Bereich für den Tetracyclin Repressor; *colE1*: Replikationsursprung.

2.2.2 pASKSurASacI

Der Vektor pASKSurASacI (Abb. 9) enthält ebenfalls das Gen für SurA, allerdings wurde hinter der die Signalpeptid-kodierenden Sequenz eine *SacI* Restriktionsschnittstelle eingeführt. Dadurch wurde Glutamin 24 zu Glutamat und Valin 25 zu Leucin mutiert. Ansonsten sind die Eigenschaften des Plasmides wie die von pASKSurA (siehe oben).

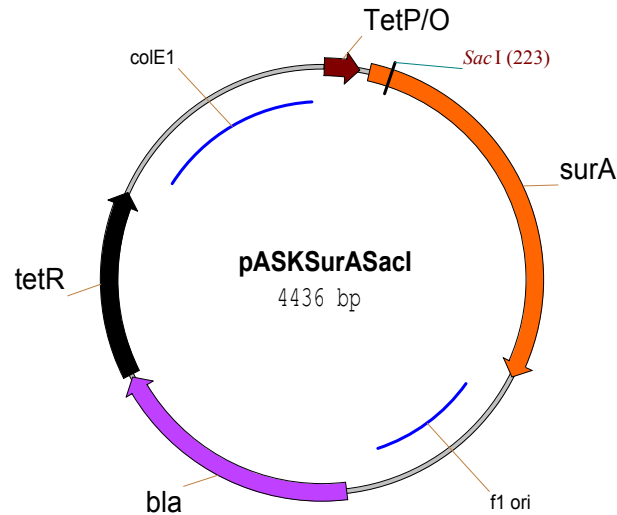


Abb. 9: Genetische Karte des Vektors pASKSurASacI. Die Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an: *surASacI*: kodierender Bereich für SurA (Q24V und E25L); *Tc* Promotor/Operator Region; *bla*: β-Lactamase-Gen, Genprodukt vermittelt Ampicillin-Resistenz; *f1*: Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1; *tetR*: kodierender Bereich für den Tetracyclin Repressor; *colE1*: Replikationsursprung.

2.3 Oligodesoxyribonukleotide

SQ78Cup

5' GTTTGATCATGGATTGTATCATCCTGCAGATG 3'

SQ78Clo

5' CATCTGCAGGATGATACAATCCATGATCAAAC 3'

SQ106Cup

5' CATCGCGAAATGCAACAACATGACGC 3'

SQ106Clo

5' GCGTCATGTTGTTGCATTCGCGATG 3'

SQ223Cup

5' CATTCTGCCGACTGCCAGGCGCTGAAC 3'

SQ223Clo

5' GTTCAGCGCCTGGCAGTCGGCAGAATG 3'

SN227Cup

5' GCAGGCGCTGTGCGGGCGGCCAGATG 3'

SN227Clo

5' CATCTGGCCGCCGCACAGCGCCTGC 3'

ASKforward

5' TACCACTCCCTATCAGTG 3'

Sur742R

5' CCTGATCAGAGGTCGGG 3'

ASKreverse

5' GTAGCCGTAAACGGCAGAC 3'

pASKupABI

5' GTAGCCGTAAACGGCAGAC 3'

pASKdownABI

5' GACAGCTATCGCGATTGCAG 3'

2.4 Enzyme und Proteine

Boehringer, MannheimDNase I (10 u/ μ l)**Institut für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie, S.Behrens** α SurA IgG (polyklonaler Antikörper, Kaninchen)**MBI Fermentas, Vilnius, Litauen**DNA-Längenstandard, Restriktionsendonukleasen, Rinderserumalbumin (BSA), T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase, *Pfu*-Turbo-Polymerase

New England Biolabs, Bad Schwalbach

Restriktionsendonukleasen, Rinderserumalbumin (BSA)

Sigma, Deisenhofen

α -Rabbit IgG (whole molecule), Alkalische Phosphatase gekoppelt (polyklonaler Anti-Kaninchen Antikörper), Citrat-Synthase

2.5 Chemikalien

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) N-Hydroxysuccinimid (NHS)

Amershan Pharmacia

ECF-Substrat

Applichem, Darmstadt

Imidazol, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)

Baker, Deventer, Holland

N',N'-Dimethylformamid

BIAcore, Uppsala, Schweden

*Desorb*I- und II-Lösungen, *Sanitize*-Lösungen mit Hypochlorid, *Amine coupling kit*, *Surfactant P20*, Thiol-Kopplungs Reagent 2-(2-pyridinyldithio)ethaneamin (PDEA)

Boehringer Mannheim, Mannheim

Ampicillin (Natriumsalz), 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dUTP

Difco, Dreieich

Bacto-Agar

Fluca, Neu-Ulm

Dimethylsulfoxid (DMSO), Bromphenolblau, Glycerin, β -Mercaptoethanol, Saccharose, Coomassie Brilliant Blue, Natriumchlorid, D(+)-Glukose Monohydrat, Glycerin, L-Cystein

DCL, Kanada

Dithiothreitol (DTT)

Gibco BRL, Eggenstein

Yeast Extract

ICN Biochemicals, Aurora, USA

Borsäure, Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA), Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan (Tris)

Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA

UltraPure Agarose (Electrophoresis Grade)

Merck, Darmstadt

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien, die zur Anwendung kamen.

Metabion, Martinsried

Oligodesoxyribonukleotide

MJ Research, Watertown, USA

Chill out 14[®] (Flüssigwachs)

MWG, Ebersberg

Oligodesoxyribonukleotide

National Diagnostics, Simerville, USA

Protogel[®], Sequagel[®] XR, Sequagel[®] Complete

Oxoid, Wesel

Agar Bacteriological, Trypton, Yeast Extract

Reanal, Budapest, Ungarn

MTSSL (1-oxy-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolin--methyl) Methanthiosulfonat,

Riedel-De Haen, Seelze

Ammoniumacetat, Chloroform, Ethanol, Formamid, Methanol, Natriumchlorid, Salzsäure, Ammoniumsulfat

Serva, Heidelberg

Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA), D(+)-Glukose Monohydrat,
Natriumdodecylsulfat (SDS), N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED),
Ammoniumpersulfat, Polyethylenglycol PEG 6000

Sigma, Deisenhofen

Borsäure, Ethidiumbromid, Polyethylenglycol 8000 (PEG), Bromphenolblau, Triethanolamin,
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Triton X-100, Chloramphenicol, Kanamycin,
TWEEN 20 (Polyethylen-Sorbitan-Monolaureat, Oligodesoxyribonukleotide

2.6 Sonstige Materialien und Geräte

American National Can., Chicago, USA

Parafilm® "M" Laboratory Film

Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

STROM 860 FluorImager

Ansell, München

Puderfreie Einmal-Handschuhe

Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Vortex® Genie 2

BIAcore, Uppsala, Schweden

Streptavidin-Chips, C1-Chips, 1 ml und 2 ml Vials aus Glas und Plastik, Biacore Geräte 1000
und 2000, letzteres wurde am MPI für biophysikalische Chemie, Abteilung Galwitz und im
Neurologischen Labor, Universitätsklinikum Göttingen, freundlicherweise zur Verfügung
gestellt.

BioRad, München

Gene Pulser® und Pulse Controller, Elektroporationsküvetten, PVDF-Membran

Biozym, Hessisch Oldendorf

PCR-Tube ultradünn, 0,2 ml

Brandt, Schweiz

Glaskapillare, Kat. Nr. 708745

CEAG Schirp Reinraumtechnik

Envirco Sterilbank

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Reaktionsgefäße 2,0 ml Safe-Lock, Reaktionsgefäße 1,5 ml,

Multipipette, Combitips für die Multipipette 0,5 ml, 1,25 ml, 2,5 ml, 12,5 ml, BioPhotometer

Genomed, Bad Oeyenhausen

JetStar Plasmid Midiprep Kit 2.0

Gilson, USA

Mikroliter-Pipetten, 1000 µl, 200 µl und 20 µl

C. A. Greiner & Söhne, Nürtingen

Petrischalen, Röhrchen 12 ml

Daniel Riester

Peptide 46, 62, 63, 71, 146 der LamB-Bibliothek, Peptide

Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Branson Sonifier W-250, SLM Aminco French Press

Heinzinger, Rosenheim

Stromversorger LNGs 350-06

Helma, Müllheim/Baden

Quarzküvetten (0,5 ml und 2 ml, 1 cm Schichtdicke)

Herolab, Wiesloch

UVT2035 302 nm UV-Leuchttisch

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Kühlzentrifuge Mikro Rapid/K, Kühlzentrifuge Rotanta/RPC, Kühlzentrifuge Roto Silenta/-RP, Kühlzentrifuge Rotixa/RP

Ingold, Steinbach/Ts

pH-Elektrode U402-M5.

IKA-Labortechnik, Staufen

Beheizbarer Magnetrührer IKAMAG RCT.

InforMax Inc, Bethesda, USA

VectorNTI7 Bioinformatik-Software, lizenziert für Institut f. Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie.

Institut für Medizinische Immunologie, Humboldt Universität zu Berlin

Peptid-Bibliotheken von LamB, OmpF, OmpA und λ -Repressor

Invitek, Berlin

Invisorb Spin Plasmid Mini Kit, Invisorb Spin DNA Extraction Kit

Kimberley-Clark, USA

Kimwipes® Papiertücher, fusselfrei

Knick, Berlin

pH-Meter 761 Calimatic

Kontron, Eching

Zweistrahl-Spektralphotometer Uvicon® 930

Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen

Wasserbad, Schüttelwasserbad

Machery-Nagel, Düren

Nucleotrap® und NucleotraP®CR Kit

Menzel-Gläser, Braunschweig

Objektträger (76 x 26 mm), Deckgläser (18 x 18 mm)

Millipore, Eschborn

Filtereinheiten Millex FG13, Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage

MJ Research, Watertown, USA

DNA Thermal Mini-Cycler® PTC-150

Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA

ImageQuant®, Software zur Auswertung von eingelesenen Fluoreszenz-Aufnahmen

Nalgene, Hereford, England

Cryoware Cryovial (2 ml-Röhrchen für Gefrierkulturen)

Peptide Speciality Laboratories, Heidelberg

Peptide 46, 46 mit IAANS markiert, 95 und 54 der Lamb Peptid Bibliothek

Pharmacia /LKB, Freiburg

Elektrophorese Stromversorger ECPS 3000/150, 2117-250 Novoblot® Elektrophoretische Transferapparatur NOVABLOT 2117-2250, 2232 MICROPERPEX® S Peristaltik-Pumpe (LKB Bromma)

Promega, Mannheim

Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System, Wizard® Plus SV MiniprepsDNA Purification System.

Sarsted, Nürnberg

Reaktionsgefäße 1,5 ml, Röhrchen 5 ml, Röhrchen 50 ml

Sartorius, Göttingen

Minisart NML Sterilfilter, Sartorius Universal U 4800P Feinwaage

Savant Instruments, Vaterstetten

Speed Vac, Concentrator SVC 200 H

Schleicher und Schuell, Dassel

Nitrozellulose-Membranen (0,45 µm), 3 MM-Filterpapier (Whatman)

Schott, Mainz

Glaswaren

Sorvall, Bad Nauheim

Zentrifuge RC-5C, Rotortypen SS34 und GSA

Terumo, Leuven, Belgien

Syringe Spritzen, 5 ml, 10 ml, 30 ml

Varian, Schweiz

EPR Spektrometer, X-Band (9 GHz) am MPI für biophysikalische Chemie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Vivascience, Hannover

Vivaspin Proteinkonzentratoren

Wilmad, USA

Quarz-Tube für EPR-Spektroskopie

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim

pH-Meter-522

Zeiss, Oberkochen

Mikroskop Axioskop mit Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz (Filtersätze: 487902 und 487909) und Kameraaufsatz, Okulare: Vergrößerung 10 ×, Sehfeldzahl 20, Objektive: Plan Neofluar 63 ×/1,25 Oil, 440480, Plan Neofluar 100 ×/1,25 Oil, 440460, Acroplan 20 ×, 440845, Immersionsöl

Ziegra, Stockport, England

Eismaschine

2.7 Nährmedien zur Anzucht von Escherichia coli**dYT-Medium**

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,6 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl

Luria-Bertani (LB) Medium

0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl

Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 120 °C autoklaviert.

Für feste Medien wurden vor dem Autoklavieren 1,8 % (w/v) Agar Bacteriological (Oxoid) zugegeben.

Antibiotika wurden aus den entsprechenden 1000-fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 25 mg/l Chloramphenicol, 100 mg/l Ampicillin, 10 mg/l Tetrazyklin bzw. 75 mg/l Kanamycin zugegeben.

2.8 Lösungen und Puffer

Alkalische Phosphatase Reaktions-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂

Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser, sterilfiltriert

Anodenpuffer I

30 mM Tris, 20% MeOH

Anodenpuffer II

300 mM Tris, 20% MeOH

APS-Stammlösung

10 % APS in Wasser

BCIP

50 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidinsalz) in 70 % Dimethylformamid

Blocking-Puffer

5 % BSA in TBS-Puffer

Chloramphenicol-Stammlösung

25 mg/ml Chloramphenicol in 96 % Ethanol

CS-Inkubationspuffer

40 mM HEPES-KOH, pH 7.5; filtriert

Cystein-Lösung

50 mM L-Cystein, 1 M NaCl, pH 4.0

dNTP-Stammlösung

je 100 mM dNTP (N = A, C, G, T), mit 1 M Tris-Base auf pH 7,0 eingestellt

dNTP-Stammlösung für die PCR

je 10 mM dNTP (N = A, C, G, T), aus dNTP-Stammlösungen mit Wasser verdünnt

E1 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA

E2 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

E3 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

3,2 M Kaliumacetat-Essigsäure, pH 5,5

E4 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat-Essigsäure, pH 5,0

E5 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat-Essigsäure, pH 5,0

E6 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

1,25 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5

EDC-Lösung

0,2 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) in sterilfiltriertem Wasser

EDTA-Lösung

0.5 M EDTA, pH 8.0

Entwickler-Lösung

566 mM NaCO₃, 31,8 mM Na₂S₂O₃, 0,05 % Formaldehyd

Ethidiumbromid-Stammlösung (10×)

10 mg/ml Ethidiumbromid

F-Puffer (Patzelt *et al.*, 2001)

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

Fixierer

50 % Methanol, 12 % Eisessig, 0,05 % Formaldehyd (37 %ig)

Formamid-Farbmarker

91,2 % Formamid, 20 mM EDTA, pH 8,3, 0,15 mM Bromphenolblau

Hoechst-Puffer (nicht reduzierend)

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

Hoechst-Puffer (reduzierend)

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

Imprägnierer

11,8 mM AgNO₃

IPTG-Stammlösung

1 M IPTG in Wasser, sterilfiltriert

Kanamycin-Stammlösung

75 mg/ml Kanamycin in Wasser

Kalziumchlorid-Lösung

100 mM CaCl₂, autoklaviert

Kathodenpuffer

25 mM Tris, 40 mM 6-amino Hexansäure, 0,01% SDS, 20% MeOH

Laemmli-Puffer (Laufpuffer für die SDS-PAGE)

25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

Lysozym Lösung

10 mg/ml Lysozym in Sukrose-Puffer

Magnesiumsulfat-Lösung

1 M MgSO₄

MP-Puffer

31 mM Tris/HCl, pH 7,6, 170 mM NaCl, 6,4 mM KCl, 0,05% TWEEN, 5% Sukrose

NBT-Stammlösung

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

Nucleotrap®- und NucleotraP®CR-Puffer (Macherey & Nagel)

Zusammensetzung der Puffer NT1, NT2, NT3, sowie der Nucleotrap®- und NucleotraP®CR-Suspension sind vom Hersteller nicht angegeben.

NHS-Lösung

0,05 M *N*-Hydroxysuccinimid (NHS), in sterilfiltriertem Wasser

PAG-Färbelösung

1000 ml Methanol, 15 g Coomassie Brilliant Blue R®

PBS-Puffer

140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄

PBST-Puffer

140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0,05 % (v/v) Tween 20

PDEA-Lösung

10 mM Di-Natrium Tetraborat pH 8,5, 1 M NaCl, 80 mM 2-(2-pyridinyldithio)ethaneamin (PDEA)

Phenol/TE

Phenol p.A. mit TE-Puffer gesättigt, 0,1 % (w/v) 8-Hydroxychinolin

Phenol/Chloroform

1 Vol Phenol/TE, 1 Vol Chloroform

Polynukleotidkinase-Puffer A (MBI Fermentas 10×)

500 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM Spermidine, 1 mM EDTA

Ponceau S-Färbelösung

0,3 % (w/v) Ponceau S (3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)-phenylazo)-2,7-naphthalendisulfonsäure), 3 % (w/v) Trichloressigsäure, 3 % (w/v) Sulfosalicylsäure

Puffer A

10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 8.0, wahlweise auch pH 6,7

Puffer B

10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5% Glycerin, 300 mM Imidazol, pH 8.0

Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas 10×)

Blau : 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂

Grün: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl

Orange: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl

Rot: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl

Gelb: 33 mM Tris-Essigsäure, pH 7, 9, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat

Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (NEB 10×)

NEB1: 10 mM Bis-Tris Propan-HCl, pH 7,0, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

NEB2: 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl 1 mM DTT

NEB3: 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT

NEB4: 20 mM Tris-Essigsäure, pH 7,9, 10 mM Magnesiumacetat, 50 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT

RNaseA-Stammlösung

10 mg/ml RNaseA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 15 mM NaCl, 20 min auf 100 °C erhitzt, langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und bei 4 °C gelagert

Sammelgelpuffer für SDS-Polyacrylamidgelle

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

Sucrose-Puffer

20 % Sukrose, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 (sterilfiltriert)

Sucrosefarbmarker

60 % (w/v) Sukrose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 1× TAE

Stop-Lösung

50 % Methanol, 12 % Eisessig

T4-DNA-Ligase-Puffer (MBI, Fermentas 10×)

400 mM Tris-HCl, pH 7,8 bei 25 °C, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP

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

50 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM MgCl₂, 1 % (w/v) Triton X 100

TBE-Puffer

89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA

TBS Puffer

31 mM Tris/HCl, pH 7,6, 170 mM NaCl, 6,4 mM KCl

TBS Tween Puffer

31 mM Tris/HCl, pH 7,6, 170 mM NaCl, 6,4 mM KCl, Tween 0,05 %

TE-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA

Tetrazyklin

10 mg/ml Stammlösung in 96 % Ethanol

Thiosulfatlösung

1,2 mM Na₂S₂O₃ in H₂O

Trenngelbuffer für SDS-Polyacrylamidgele

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

Tris-Puffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (z.B. Sigma 7–9) in Wasser auflösen und den pH-Wert mit Säure einstellen. Für Tris-HCl wird Salzsäure, für Tris-Acetat wird Essigsäure verwendet.

Western Blot-Transferpuffer

25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit demineralisiertem Wasser (Millipore, Nanopore-Wasser-Anlage) angesetzt.

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

3.1.1 Stammhaltung und Lagerung von *Escherichia coli*-Zellen

Die verwendeten Bakterienstämme von *Escherichia coli* wurden zur längerfristigen Aufbewahrung als Glycerinkulturen gelagert. Dazu wurden 2 ml autoklaviertes Glycerin mit 1 ml einer Übernachtskultur des betreffenden Bakterienstammes vermischt und bei -20 °C aufbewahrt. Bakterienstämme, die häufig verwendet wurden, wurden entsprechenden Selektivplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C angezogen und konnten so bei 4 °C für einige Wochen aufbewahrt werden.

3.1.2 Vermehrung von *E. coli*

Die Stämme wurden in dYT-Medium bei 37 °C angezogen. Waren die Stämme antibiotikaresistent, so wurde dem Medium das entsprechende Antibiotika zugesetzt. Kulturen von einem Volumen von 5 ml oder weniger wurden in Reagenzröhrchen auf einem Roller gerollt, größere Kulturen wurden im Kolben auf einem Schüttler bei 150 U/min geschüttelt.

3.1.3 Bestimmung der Zelldichte

Die optische Dichte der bewachsenen Kultur wurde in einem Kontron Photometer (*Uvicon® 930*) bei 600 nm gegen das unbeimpfte Medium bestimmt. Die Zellen wurden so verdünnt, daß die OD_{600} kleiner als 1 war. Die tatsächliche Zelldichte wurde dann aus dem gemessenen Wert errechnet.

3.1.4 Präparation und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock

Es wurden 300 ml dYT-Medium in einem 1 l Kolben mit Zellen des entsprechenden Stammes angeimpft und bei 37 °C und 100 U/min bis zu einer OD_{600} von 0,4 - 0,5 angezogen. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und in 50 ml Falcon Röhrchen überführt und durch Zentrifugation in einer Hettich Rotanta/RPC Zentrifuge bei 4000 U/min für 10 min bei 4 °C geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 40 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung vorsichtig resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die Zellen wurden weiterhin mit 30 und 15 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung gewaschen. Danach wurde das Pellet in 3 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung resuspendiert, 105 μl DMSO zugegeben und Aliquots zu 200 μl in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Diese wurden dann bei -70 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA wurde

in einem Volumen von maximal 20 μl zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt (Inoue *et al.*, 1990). Anschließend wurden der Transformationsansatz auf Eis abgekühlt und 800 μl 37 °C warmes dYT- Medium zugegeben. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurden die Proben 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend Aliquots auf Selektivagar ausplattiert.

3.1.5 Präparation elektrokompenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 50 ml dYT-Medium mit 500 μl einer frischen Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 - 0,6 angezogen und dann für 30 min auf Eis plaziert. Danach wurde die Kultur in einer Hettich Rotanta/RPC Zentrifuge bei 4000 U/min für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Medium wurde dann vollständig dekantiert und die Zellen in 50 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 40 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 30 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in dem Rest Wasser, das sich noch an der Gefäßwand befand, resuspendiert. Falls notwendig, wurden die Zellen mit eiskaltem Wasser auf das erforderliche Volumen gebracht.

3.1.6 Transformation von *Escherichia coli* durch Elektroporation

Zur Transformation wurden 50 - 150 μl Zellsuspension (3.1.5) mit einer adäquaten DNA-Menge versetzt und in eine gewaschene und vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte nach 20 minütiger Inkubation des Zell/DNA-Gemisches auf Eis im Gene Pulser® (BioRad) bei folgenden Einstellungen: Schichtdicke der Elektroporationsküvette 1cm, 200 mA Stromstärke, 2,5 V Spannung, 6250 V/cm Feldstärke, 5 s Impuls, Raumtemperatur. Unmittelbar nach dem Spannungspuls wurde 1 ml steriles dYT-Medium in die Elektroporationsküvette pipettiert, der Inhalt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellsuspension für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf Selektivplatten ausgestrichen bzw. 50 ml selektiven dYT-Mediums mit der Kultur beimpft.

3.1.7 Induktion der Proteinproduktion

Die jeweilige Bakterienkultur wurde angeimpft und beim Erreichen einer OD_{600} von 0,2 bis 0,4 mit dem jeweiligen Induktor induziert. Im Fall von Tetracyclin eine Endkonzentration von 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Skerra, 1994). Die Inkubationsdauer bis zur Weiterverarbeitung der Bakterienkultur hing von dem jeweiligen Experiment ab.

3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

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

3.2.2 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

3.2.2.1 Fällung von DNA mit Ethanol

Die Ethanolfällung diente der Konzentrierung von DNA und der Entfernung von Salzen. Diese wurden zwar nicht vollständig, für viele Zwecke jedoch in ausreichendem Maße entfernt. Zur Fällung wurde die Konzentration monovalenter Kationen erhöht, was durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante die Abstoßung des negativ geladenen Phosphodiester-Rückgrats verminderte, wodurch bei Lösungsmittelentzug durch Zugabe von Ethanol die DNA-Fällung ermöglicht wurde.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 7 M Ammoniumacetat-Lösung und 3 Vol 96 % Ethanol p.A. je nach zu erwartender DNA-Menge 5 bis 45 min bei -20 °C gefällt und danach bei 13000 U/min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde optional mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Ethanol wurde sodann so gut wie möglich abgetrennt. Dazu wurden die Gefäße nach Entfernen des Überstandes offen 10 min bei 37 °C im Heizblock stehengelassen. Anschließend wurde das DNA-Pellet je nach gewünschter Konzentration in einem entsprechenden Endvolumen Millipore-Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

3.2.2.2 Fällung von DNA mit Isopropanol

DNA kann auch mit Isopropanol anstelle von Ethanol gefällt werden. Bei der Verwendung von Isopropanol wird die Präzipitation von Salzen vermindert. Diese Art der Fällung bietet sich daher besonders dann an, wenn Salze aus der zu fällenden Lösung entfernt werden sollen. Allerdings ist Isopropanol weniger flüchtig als Ethanol und daher schlechter zu entfernen. Es wurde analog zur DNA-Fällung mit Ethanol verfahren. Im Unterschied dazu wurden jedoch nur 0,7 Vol bis 1 Vol Isopropanol eingesetzt. Wie auch nach der Ethanolfällung wurde anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen.

3.2.3 Extraktion von DNA in wäßrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln

3.2.3.1 Präparation einer Phenollösung

500 g festes Phenol wurden in 130 ml Wasser, 7,5 ml 2 N NaOH und 6 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 gelöst (Grinsted und Bennett, 1988). Zum Schutz vor Oxidation wurde 8-Hydroxychinolin (0,1 % (w/v)) hinzugefügt und die Lösung lichtgeschützt in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur gelagert.

Die so präparierte Phenollösung wird im Folgenden als Phenol, die Mischung aus je 50 % (v/v) Phenollösung und Chloroform wird im Folgenden als Phenol/Chloroform bezeichnet.

3.2.3.2 Extraktion von DNA mit Phenol, Phenol/Chloroform oder Chloroform

Zur Entfernung von Proteinen, Ethidiumbromid oder Resten anderer hydrophober Kontamination diente die Extraktion von DNA mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform. Die Extraktion mit Chloroform diente auch der Entfernung von Phenol aus der wäßrigen Phase.

Die DNA-Lösung wurden mit 1 Volumen Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform versetzt und gründlich gemischt. Um die zwei Phasen zu trennen, wurde der Ansatz in einer Tischzentrifuge bei 13 000 U/min für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend die wäßrige Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In der Regel folgte auf eine Extraktion mit Chloroform eine Ethanolfällung zur Konzentrierung der DNA.

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von doppel- und einzelsträngiger DNA wurde in Agarosegelen unterschiedlicher Größe und Konzentration (1 % - 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer) durchgeführt. Lange Fragmente wurden in niederprozentigen, kurze Fragmente in höherprozentigen Gelen aufgetrennt. Analytische Gele besaßen eine Agarosekonzentration von 1 % (w/v). Die Agarose wurde im Puffer bis zur vollständigen Lösung in einem Mikrowellenofen aufgeköcht. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C wurde zum Anfärben von DNA in der Regel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Das Gel wurde in eine Gelschale gegossen und der Taschenkamm gesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Taschenkamm entfernt und das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Es wurde soviel Puffer hinzugefügt, bis das Gel komplett bedeckt war. Alternativ wurden Flachbett-Gelkammern (100 × 7 × 0,5 mm) verwendet, bei denen das Gel direkt in einen abgegrenzten Bereich der Elektrophoresekammer gegossen wurde. Die Proben wurden mit mindestens 1/5 Vol Sucrosefarbmarker versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung zwischen 40 V und 130 V für 30 - 60 min durchgeführt (5 bis 10 V/cm Feldstärke). Die aufgetrennten DNA-Fragmente

wurden im UV-Durchlicht (302 nm) durch Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Längen- und Konzentrationsbestimmung für die resultierenden DNA-Banden wurden DNA-Fragmentlängenstandards (DNA-Konzentration: 100 ng/ μ l) verwendet.

3.2.5 Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe des Nucleotrap[®]-Kits

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *Nucleotrap*[®]-Kit von Macherey & Nagel verwendet. Die aus dem Gel aufzureinigende DNA wurde auf dem UV-Durchlicht-Tisch mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Pro 100 mg Gelmasse wurden 300 μ l NT1-Puffer zugegeben. Nach Zugabe von 20 μ l *Nucleotrap*[®]-Suspension wurde der Ansatz ca. 10 min bei 50 °C inkubiert und ca. alle 2 min kurz gevortext. Letztendlich war das Gelmaterial vollständig aufgelöst. Nach Zentrifugation bei 13000 U/min für 30 s bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgetrennt und das Pellet durch Zugabe von 500 μ l NT2-Puffer, kurzem Vortexen, Zentrifugieren (s.o.) und Abnehmen des Überstandes gewaschen. Nach Wiederholung des Waschschrilles mit 500 μ l NT2-Puffer und danach mit 500 μ l NT3-Puffer wurde das Pellet an der Luft 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte durch Inkubation bei 50 °C für 5 min durch Zugabe von 50 μ l H₂O und Durchmischen der Suspension ca. alle 3 min. Nach Zentrifugation bei 13000 U/min für 2 min bei Raumtemperatur wurden ca. 50 μ l gereinigte, wässrige DNA-Lösung erhalten

3.2.6 Abtrennung von Oligonukleotiden und kurzen DNA-Fragmenten mit Hilfe des NucleotraPCR[®]-Kits

Um aus einer komplexen DNA-Lösung kurze DNA-Fragmente (z.B. PCR-Primer) zu entfernen, wurde das *NucleotraPCR*[®]-Kit der Firma Macherey & Nagel eingesetzt. Die *NucleotraPCR*[®]-Suspension schließt dabei DNA-Fragmente mit einer Größe von bis zu 150 bp von der Präzipitation aus. Es wurde nach dem "direct purification"-Protokoll verfahren. Die DNA-haltige Lösung wurde mit Wasser auf ein Volumen von 100 μ l gebracht und einer Extraktion mit Chloroform unterzogen (3.2.3.2.). Die wässrige Phase wurde in der Regel mit 10 μ l *NucleotraPCR*[®]-Suspension und 400 μ l NT2-Puffer versetzt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur, wobei der Ansatz ungefähr alle 3 min durchmischt wurde. Es wurde bei 12 000 U/min für 30 s bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-enhaltende Pellet wurde in 400 μ l NT2-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten zwei Waschschrilles mit je 400 μ l NT3-Puffer, wobei nach Abtrennung des Überstandes nach dem zweiten Durchgang das Pellet erneut

zentrifugiert und der letzte Rest an Flüssigkeit abgenommen wurde. Das Pellet wurde nun für 15 min bei 37 °C getrocknet und zur Elution im Anschluß in 50 µl Wasser aufgenommen. Dabei wurde die Mischung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und alle 2 min gemischt. Nach Zentrifugation wie oben angegeben wurden ca. 50 µl gereinigte, wässrige DNA-Lösung erhalten.

3.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration in wäßrigen Lösungen

Die DNA-Konzentration wurde in einem Kontron Zweistrahl-Spektralphotometer (*Uvicon® 930*) ermittelt. Für doppelsträngige DNA wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Mikroküvette (Hellma, QS 1,000) gegen Wasser gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml. Durch zusätzliche Messung der Lösung bei 280 nm konnte eine Aussage über die Reinheit der Lösung gemacht werden. Für eine proteinfreie Nukleinsäurelösung sollte das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ ungefähr 2:1 sein.

3.2.8 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation) mittels alkalischer Lyse

Zur Isolierung von Plasmid DNA im analytischen Maßstab wurden 2 ml einer Übernachtskultur in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (2 Min bei 13.000 U/min, Raumtemperatur). Das Pellet wurde in 100 µl Jetstar E1-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl E2-Puffer kommt es dann unter leichtem Schwenken des Reaktionsgefäßes zur Lyse der Zellen. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden anschließend 150 µl E3-Puffer durch fünfmaliges Schwenken untergemischt. Diese Mischung wurde für 10 min auf Eis inkubiert – in dieser Zeit kommt es zum Ausfallen der Proteine – und dann bei 4 °C für 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde schließlich einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert (3.2.3.2.) und mit Ethanol gefällt (3.2.2.1.).

3.2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi-Präparation) mit Hilfe des JetStar-Kits

Zur Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab kam das JetStar-Kit der Firma Genomed zum Einsatz, welches ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht. 50 ml Bakterienkultur wurden in der Hettich Rotanta Zentrifuge für 10 min bei 4000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 4 ml E1-Puffer resuspendiert, die Bakterien wurden durch Zugabe von 4 ml E2-Puffer lysiert. Die Reaktion wurde nach 5 min durch Zugabe von 4 ml E3-Puffer gestoppt und der Ansatz erneut in der Hettich Zentrifuge für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde dann auf die Säule, welche zuvor mit 10 ml Puffer E4 äquilibriert worden war, gegeben

und anschließend die gebundene DNA zweimal mit je 10 ml E5-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von 5 ml E6-Puffer wurde die DNA eluiert. Diese wurde danach durch Hinzufügen von 0,7 Vol Isopropanol und anschließender Zentrifugation in einer Hettich Mikro Rapid Zentrifuge bei 12000 U/min für 30 min bei 4 °C gefällt. Nach der Fällung wurde die DNA in 50 µl Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt (3.2.7.).

3.3 Enzymatische Manipulation von DNA

3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom jeweiligen Hersteller des Enzyms empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten. Gleichzeitige Spaltungen mit mehreren Enzymen wurden unter den Pufferbedingungen durchgeführt, bei denen laut Hersteller die Endonukleasen mindestens 50 % bis 100 % Spaltaktivität besaßen. War eine Doppelspaltung wegen Inkompatibilität der Enzyme in den mitgelieferten Puffern nicht möglich, wurde die DNA nach der ersten Spaltung mit Ethanol gefällt. In der Regel wurden pro µg DNA 2 – 3 Units Enzym eingesetzt und der Ansatz für 1 – 3 h inkubiert. Wurde über Nacht inkubiert, so wurden entsprechend der Herstellerangaben entsprechend geringere Mengen an Enzym verwendet.

3.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten zu einem Ligationsprodukt wurde mit einem bis zu fünffachen molaren Überschuß an DNA-Insert-Fragment gegenüber dem DNA-Vektor-Fragment durchgeführt. Verwendet wurde der T4 DNA-Ligase-Puffer unter Zusatz von BSA und ca. 2 Units T4 DNA-Ligase in einem Endvolumen von 20 µl. Die Reaktion erfolgte in der Regel über Nacht bei ca. 12 °C. Der Ligationsansatz wurde vor einer Transformation von elektrokompenten *E. coli*-Zellen mit Phenol/Chloroform und mit Chloroform extrahiert (optional zur Erhöhung der Transformationseffizienz, 3.2.3.2.) und mit Ethanol gefällt (3.2.2.1) und in 20 µl Wasser aufgenommen.

3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion steht eine potente *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zur Verfügung (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Mit ihr ist es möglich, aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus selektiv eine DNA-Matrize zu vervielfachen. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA-Vorlage durch Erhitzen in einzelsträngige DNA überführt (Denaturierung). Beim Absenken der Temperatur lagern sich zwei Oligonukleotid-Primer an die Matrizen-DNA an (Primer-Annealing) und flankieren die zu amplifizierenden komplementären Zielregionen. Die Primer werden mit Hilfe

einer thermostabilen Polymerase komplementär zur ursprünglichen Duplex-DNA bei hoher Temperatur verlängert (Primer-Extension), um unspezifische Hybridisierung der Primer an die Matrize zu verhindern. Es wird eine bestimmte Anzahl an Amplifikationszyklen durchgeführt, wodurch sich die durch die beiden Primer flankierte DNA-Region akkumuliert.

Die PCR-Bedingungen mußten je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz sowie der Länge und des G/C-Gehaltes der verwendeten spezifischen Primer angepaßt werden. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Als Matrize wurden ca. 5 – 10 ng DNA eingesetzt, in Einzelfällen war die DNA-Menge höher (bis 100 ng).

In die PCR-Reaktionsgefäße wurden 25 µl Taq-Puffer (1×) und Template DNA gegeben.

Als Mastermix wurden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

2,5 µl Puffer (10×)

1 µl 10 mM dNTP

je 1 µl Primer (10 pMol/µl)

ad 25 µl Wasser

Je 25 µl des Mastermix wurden in die Reaktionsgefäße gegeben. Zur Vermeidung von Primer-Fehlpaarungen wurde der Mastermix erst nach der initialen zweiminütigen Denaturierungsphase bei 98 °C zu der Matrizen-DNA gegeben. Diese Abwandlung der PCR wird als Hot Start-PCR bezeichnet. Im Allgemeinen wurde dieser der Vorzug gegenüber der konventionellen PCR gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden vor Plazierung in dem PCR-Cycler mit PCR-Wachs (Chill-out 14, MJ Research) oder Mineralöl überschichtet.

Die Länge und die Temperatur der einzelnen Reaktionsschritte der PCR-Zyklen, sowie deren Anzahl wurde durch die Wahl der Matrize, die Basenzusammensetzung, Länge der Primer und durch die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt. Die Elongationsreaktion (Primer-Extension) wurde bei 72 °C durchgeführt. Die Elongationsrate von Taq-Polymerase wurde bei 1000 bp pro Minute angenommen. Die Anzahl der Zyklen betrug zwischen 20 und 30. Die Schmelztemperatur T_M eines Oligonukleotids wurde nach folgender empirischer Formel (1) berechnet, welche sowohl den relativen G/C-Gehalt (% G/C) als auch die Länge der Oligonukleotide berücksichtigt:

$$T_M [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41 \cdot (\% \text{ G/C}) - \frac{650}{n} \quad (1)$$

Die errechnete Temperatur lag in der Regel zwischen 45 °C und 60 °C. Die optimale *Annealing*-Temperatur T_A für eine Polymerasekettenreaktion wurde nach (2) bestimmt:

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

T_{M1} und T_{M2} stehen dabei für die Schmelztemperaturen der beiden verwendeten Primer.

Die einzelnen Zyklen für die PCR waren:

98 °C für 2 min

85 °C bis der Mastermix zugegeben war

94 °C 30s

annealing Temperatur (T_A) 30 s

72 °C 1 min pro kb Produkt (Minimum 30 s) } 30 ×

3.3.4 Kolonie-Durchmusterung mittels PCR

Um Klonierungen auf korrekte *inserts* zu überprüfen, wurde teilweise eine Sonderform der PCR, die Kolonie-PCR (Hofmann und Brian, 1991) angewandt. Dabei amplifiziert man das betreffende Produkt direkt aus den Bakterien. Dadurch entfällt die vorherige Präparation der Plasmid-DNA, was eine deutliche Arbeitersparnis mit sich bringt.

Kolonie-PCR wurde mit im Institut isolierter *Taq*-Polymerase oder kommerziell erhältlicher *Taq*-Polymerase von Invitex durchgeführt. Bei der Prozedur wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte gepickt und separat auf eine Replikaplatte ausgestrichen. Die an dem Zahnstocher verbleibenden Bakterien wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß in 25 µl vorgelegtem 1× *Taq*-Puffer resuspendiert. Die Zusammensetzung der PCR und die Bedingungen waren wie in 3.3.3 beschrieben. Durch Agarosegelelektrophorese (3.2.4) der PCR Produkte wurden dann die Plasmide der Klone, die ein *insert* der richtigen Länge trugen, identifiziert.

3.3.5 Quick change mutagenesis PCR (Stratagene)

Für diese Form der PCR (Nelson und McClelland, 1992; Wang und Malcolm, 1999) wurden spezielle Oligonukleotide eingesetzt, die den Austausch von Nukleotiden ermöglichen. Die Oligonukleotide, mindestens 24–28 Basen, wurden so definiert, dass an der entsprechenden Position in der DNA-Sequenz ein gewünschtes Nukleotid gegen ein beliebiges anderes ersetzt wird. Die flankierenden Bereiche um das auszutauschende Nukleotid sollten mindestens 10 Basen umfassen, damit das Oligonukleotid trotz einer möglichen Fehlpaarung mit dem auszutauschenden Nukleotid anhybridisiert.

Es wurden je 100 ng des *Template*, 2 pmol/µl der entsprechenden Oligonukleotide, 0,2 pmol/µl dNTP, 2,5 Units *Pfu*-Turbo Polymerase und *Pfu*-Puffer mit MgSO₄ eingesetzt. Das

Reaktionsvolumen betrug 50 μl .

PCR-*Cycler* Programm:

95 °C, 5'	} 20 ×
95 °C, 30"	
55 °C, 1'	
68 °C, 14'	
68 °C, 10'	

Die *annealing* Temperatur T_A hängt von der Zusammensetzung der Oligonukleotide ab und wurde jeweils individuell angepasst (siehe 3.3.3).

3.3.6 Auffüllen von überhängenden Enden mit T4-DNA-Polymerase

Zur Erzeugung von glatten DNA-Enden wurde T4-DNA-Polymerase (MBI, Fermentas) benutzt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μl in T4-DNA-Polymerase-Puffer (MBI, Fermentas) mit 0,5 mM dNTPs und 1 Einheit (u) Enzym für 20 min im Kühlraum. Anschließend wurde die aufgefüllte DNA mittels Phenol/Chloroform Extraktion (3.2.3.2.) gereinigt und mit Ethanol gefällt (3.2.2.1).

3.4 Biochemische Arbeitsmethoden

3.4.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine lassen sich unter denaturierenden Bedingungen über SDS-haltige Polyacrylamidgele ihrer Größe nach auftrennen (Laemmli, 1970) Das in den Gelen enthaltene SDS ist ein Detergenz und besitzt die Fähigkeit, Sekundär- und Tertiärstrukturelemente von Proteinen aufzulösen. Es wurden ausschließlich 12,5 %ige SDS-Polyacrylamidgele (v/v) verwendet.

3.4.1.1 Herstellung 12,5 %iger (v/v) Polyacrylamidgele

In einem Giesstand konnten 5 oder 10 Gele gleichzeitig hergestellt werden. Dabei wurden die Gele zwischen eine Glas- und eine Aluminiumoxidplatte gegossen. Das Trenngel wurde als erstes gegossen. Dabei wurden die Komponenten wie in Tabelle 1 aufgeführt zusammen gemischt. Die Lösung wurde bis zu einer Höhe von ca. 2/3 in den Giesstand gegossen und einzeln mit je 500 μl Isopropanol überschichtet. Sobald das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Sammelgel gegossen, vorher jedoch des Isopropanol entfernt. Dabei wurden die Komponenten wie in Tabelle 2 aufgeführt zusammen pipettiert und direkt auf das Trenngel gegossen.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Trenngels

Trenngel	5 Gele	10 Gele
Lösungen	einzusetzende Menge [ml]	einzusetzende Menge [ml]
Acrylamid (Protogel®)	13,80	27,60
Trenngelpuffer	7,20	14,40
SDS 10%	0,72	1,44
APS (10 %)	0,12	0,24
TEMED	0,02	0,04
Wasser	13,60	27,20

Anschließend wurden die Taschenkämme gesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gele unmittelbar verwendet oder einzeln in mit demineralisiertem Wasser befeuchtete Papiertücher gewickelt und mit Frischhaltefolie umhüllt. So verpackt konnten die Gele einige Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel	5 Gele	10 Gele
Lösungen	einzusetzende Menge [ml]	einzusetzende Menge [ml]
Acrylamid (Protogel®)	2,24	4,48
Sammelgelpuffer	1,40	2,80
SDS 10%	0,28	0,56
APS	0,05	0,10
TEMED	0,01	0,03
Wasser	10,20	20,40

3.4.1.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Polyacrylamidgele wurden in der Laufkammer befestigt und die Kammer mit Laemmli-Laufpuffer befüllt. Nach dem Entfernen des Taschenkamms wurden die Proteinproben, welche zuerst mit 1/4 Volumen reduzierendem Hoechst-Puffer gemischt worden waren, in die Geltaschen gefüllt. Als Protein-Molekulargewichtsstandard, von dem pro Spur 5 µl aufgetragen wurden, diente der 14.000 bis 116.000 M_r Leiter Protein-Standard der Firma Fermentas. Die Elektrophorese wurde bis zum Durchlauf der Farbmarkerbande bei 25 mA pro Gel durchgeführt.

3.4.1.3 Coomassie-Färbung eines SDS-Polyacrylamidgels

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurde das Gel in einer Schale mit einer Lösung aus 10 ml Coomassie und 10 ml 30%-iger Essigsäure unter leichtem Schütteln eingefärbt. Die Entfärbung fand durch Kochen in Wasser statt.

3.4.1.4 Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels

Diese Färbemethode (Blum *et al.*, 1987) ist im Vergleich zur Coomassie-Färbung wesentlich

sensitiver, da die Detektionsbereiche für eine Coomassie-Färbung bei 100 ng, für eine Silberfärbung bei 1–10 ng eines Proteins liegen. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese aus der Laufkammer ausgebaut und für mindestens 15 min in Fixierer geschwenkt. Es folgte das Waschen des Gels mit 50 % Ethanol, für 2 x 10 min bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Inkubation in frisch angesetzter Thiosulfatlösung, 1 Minute bei Raumtemperatur. Weiterhin wurde das Gel dreimal 20 s mit H₂O dest gewaschen und danach für mindestens 15 min in Imprägnierer geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit H₂O dest wurden die Proteinbanden durch Inkubation mit Entwicklerlösung sichtbar gemacht. Zum Abstoppen der Entwicklung wurde kurz mit H₂O dest gewaschen und das Gel für mindestens 15 min mit Stop-Lösung (50 % Methanol, 12 % Eisessig) inkubiert. Nach kurzem Wässern konnte das Gel dokumentiert und in Wasser gelagert werden.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen

Die Proteinkonzentration einer wässrigen Lösung wurde mit Hilfe des Spektrophotometers bei 280 nm bestimmt. Die Absorption von Licht einer Wellenlänge von 280 nm (OD_{280}) ist hierbei Charakteristikum eines Proteins. Als Referenzsubstanz wurde der Proteinpuffer verwendet. Die Proteinlösungen wurden soweit verdünnt, daß die gemessene OD einen Wert von 1 nicht überschritt. Die aromatischen Aminosäureseitenketten des Proteins sind an der Absorption des Lichtes wesentlich beteiligt. Tryptophanreste haben hierbei den höchsten molaren Extinktionskoeffizienten von $5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, gefolgt von Tyrosinresten mit $1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und Disulfidbrücken mit $125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Ist die Zusammensetzung des Proteins bekannt, so kann der molare Extinktionskoeffizient durch folgende Gleichung (3) berechnet werden (Pace *et al.*, 1995):

$$\varepsilon(\text{Protein}) = 5500 * \left[\sum \text{Trp} \right] + 1490 * \left[\sum \text{Tyr} \right] + 125 * \left[\sum \text{Disulfid} \right] \quad (3)$$

Mit Hilfe des so berechneten molaren Extinktionskoeffizienten kann die Konzentration der Proteine aus der gemessenen OD_{280} nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet werden:

$$A = \varepsilon l C$$

A ist die Absorption, ε die molare Extinktionskoeffizient, l die Schichtdicke und C die Proteinkonzentration (M).

3.4.3 Isolierung von Proteinen aus *E. coli*

3.4.3.1 Isolierung periplasmatischer Proteine aus *E. coli* im präparativen Maßstab

Aus einer Einzelkolonie des entsprechenden Produktionsstammes (44102 pASKsurA und 44102

pASKsurAN+Ct) wurde eine 50 ml Vorkultur in mit Antibiotikum komplettiertem dYT-Medium hergestellt. 12–14 ml dieser Kultur wurden dann dazu verwendet, eine 1000 ml Kultur von mit Antibiotikum komplettiertem LB-Medium anzupflanzen. Diese wurde dann bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,2 – 0,25 wurde der Induktor Tetrazyklin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben. Es konnte Tetrazyklin verwendet werden, weil der Stammhintergrund eine Resistenz diesem Antibiotikum gegenüber vermittelt. Das weitere Wachstum erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von mindestens 1. Die Kultur wurde durch Zentrifugation in einer Hettich RotoSilenta/RP Zentrifuge bei 4000 U/min für 15 min bei geerntet. Anschließend wurde das Zellpellet auf Eis in ca. 20 ml eiskaltem Sukrose-Puffer resuspendiert, in vorgekühlte Sorvall GSA Gefäße überführt und für ca. 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation in einer Sorvall RC-5C Zentrifuge mit GSA-Rotor bei 8000 U/min für 15 min bei 4 °C wurde zunächst das Feuchtgewicht des Pellets bestimmt. Dieses wurde in 10 ml/g Feuchtgewicht Sukrose-Puffer aufgenommen und mit Lysozym (Endkonzentration 10 µg/ml) sowie 0,5 M EDTA, pH 8,0 (Endkonzentration 1 mM) versetzt. Nach der anschließenden 30 – 45 minütigen Inkubationsphase wurde die Probe mit 1 M MgSO₄, auf eine Endkonzentration von 20 mM gebracht, um die durch das Lysozym und EDTA destabilisierte äußere Membran wieder zu stabilisieren. Durch eine anschließende Zentrifugation einer Hettich RotoSilenta/RP Zentrifuge bei 9000 U/min für 10 min bei 4 °C wurden unlösliche Proteine und die Spheroplasten entfernt. Der klare Überstand wurde entnommen und in 50 ml-Falcon-Röhrchen auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert. Ein Aliquot von ca. 50 µl dieses Periplasma-Überstandes wurde für weitere Analysen entnommen.

3.4.3.2 Gewinnung von Gesamtzellextrakt von *E. coli* Zellen

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakt von *E.coli* zu analytischen Zwecken wurden die Bakterien einer 50 ml Kultur durch Zentrifugation in einer Hettich RotoSilenta/RP Zentrifuge bei 4000 U/min für 15 min bei 4 °C geerntet. Das Pellet wurde in ca. 5 ml Puffer A resuspendiert und die Zellen in einer *French Press* (SLM Aminco) bei 1000 psi mit 3 – 4 Passagen auf Stufe *high* aufgeschlossen. Das Lysat wurde in einem Falconröhrchen gesammelt und durch Zentrifugation in einer Hettich RotoSilenta/RP Zentrifuge bei 4000 U/min für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, um noch intakte Zellen und ausgefallenes Protein zu entfernen.

3.4.4 Reinigung von Proteinen

3.4.4.1 Reinigung über immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Proteine, welche eine terminale Oligohistidinsequenz aufwiesen, wurden über immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt. Dazu wurde zunächst die Säulenmatrix (2 – 4 ml Chelating Sepharose® (Pharmacia)) mit mindestens 10 ml Wasser

gewaschen. Auf die Säulenmatrix wurden anschließend 10 ml 500 mM NiCl₂-Lösung gegeben und mit 2 × 10 ml Wasser gewaschen sowie mit 10 ml Sukrose-Puffer äquilibriert. Die so vorbereitete Matrix wurde in eine 15 ml Säule (Durchmesser 12 mm) mit vorgelegter Fritte gegeben. Es erfolgte der Auftrag der in Sukrose-Puffer gelösten Proteine. Die Säule wurde mit je 250 ml Puffer mit 0, 5 und 10 mM Imidazol gewaschen und anschließend schrittweise die Elution gebundener Proteine durchgeführt. Eluiert wurde mit steigender Konzentration von Imidazol in Puffer A. Es wurde mit 15 ml 15, 20, 40, 80, 150 und 300 mM Imidazol eluiert. Aliquots der Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert. Die Säulenmatrix wurde wie beschrieben regeneriert, bevor sie wieder verwendet wurde.

3.4.4.2 Proteinreinigung mittels Gelfiltrations-Chromatographie

Zusätzlich zur IMAC-Reinigung von Proteinen wurde, wenn erforderlich, eine Gelfiltrations-Chromatographie herangezogen. Durch den Einsatz dieser Methode konnte auch ein Umdialysieren umgangen werden, da hier das Protein in dem zur Gelfiltration eingesetzten Puffer eluiert wird. Das Prinzip der Reinigung beruht auf der Auftrennung nach Molekülgröße. Die Säulen-Matrix (Superdex, Amersham Biosciences) besteht aus einem porenhaltigem Material, zusammengesetzt aus vernetztem Dextran und Agarose, das eine längere Verweildauer von kleineren Molekülen in der Matrix bedingt (Kågedal *et al.*, 1991). Daher werden große Moleküle, die nicht so tief in die Matrix eindringen können, zuerst eluiert, während kleinere Moleküle später von der Säule gewaschen werden. Dieses Trennsystem ermöglicht eine schonende Reinigung von Proteinen, da hier, im Gegensatz zu HPLC-Methoden, keine Denaturierung stattfindet und das Protein in dem adäquaten Puffer ohne zusätzliche Lösungsmittel eluiert wird.

Es wurden für analytische Reinigungen Superdex 75 bzw. 200 10/30 Säulen (Pharmacia), für präparative Zwecke Superdex 75 bzw. 200 16/60 Säulen (Pharmacia) eingesetzt. Puffer wurde mit der FPLC-Anlage über die Säule gepumpt. Die Fraktionen wurden mit 2,5 ml Volumen gesammelt, mittels SDS-PAGE analysiert und entsprechend eingeeengt (3.4.4.3.).

3.4.4.3 Konzentrieren von Proteinlösungen mit *Vivaspin*-Konzentratoren

Für die nicht-denaturierende Konzentration von Protein-Lösungen wurden *Vivaspin* Konzentratoren (Vivascience) mit einer adäquaten molekularen Ausschlussgröße benutzt. Die einzukonzentrierende Lösung wurde direkt auf die Polyethersulfon-Membran gegeben und bei der vom Hersteller angegebenen Geschwindigkeit durch Zentrifugation in einer Hettich RotoSilenta/RP Zentrifuge bei 4 °C zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht war.

3.4.4.4 Dialyse von Proteinlösungen

Die Umpufferung von Proteinlösungen wurde mittels Dialyse über Nacht im Kühlraum gegen

ein 1000faches Volumen des entsprechenden Puffers unter leichtem Rühren durchgeführt. Dazu wurden Dialyseschläuche der Firma Roth mit der Ausschlußgrenze von ca. 12 000 M_r mit der Proteinlösung gefüllt.

3.4.4.5 Lagerung der SurA-Proteine

Zur Lagerung der gereinigten Proteine für einige Tage bis Wochen wurde die wäßrige Lösung in Reagiergefäßen auf Eis gelagert.

3.4.5 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose -Membranen über die Bindung von Antikörper-gekoppelter Alkalischer Phosphatase (Western Blot)

Zum immunochemischen Nachweis von in SDS-Gelen aufgetrennten Proteinen wurden diese mittels Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierzu wurde ein Filterpapier (Whatman MM) in der Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten, mit *Western Blot*-Transferpuffer getränkt und auf die Graphitanode einer Novoblot[®]-Apparatur gelegt. Auf das Filterpapier wurde eine auf Gelgröße zugeschnittene Nitrozellulose-Membran gelegt, welche zuvor ebenfalls in *Western Blot*-Transferpuffer getränkt worden war. Das die Proteine enthaltende Polyacrylamidgel wurde in *Western Blot*-Transferpuffer geschwenkt und in nassem Zustand auf die Nitrozellulose gelegt. Ein weiteres Filterpapier, auf Gelgröße zugeschnitten, wurde, ebenfalls getränkt, darauf gelegt. Es folgten das Aufsetzen der Kathode und der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran für ca. 1h bei einer konstanten Spannung von 10 V. Nach dem Transfer wurde die Membran für 3 min in Ponceau S-Färbelösung inkubiert, wodurch die gebundenen Proteine sichtbar wurden. Mit einem Bleistift wurden die Markerbanden angezeichnet, bevor die Membran zweimal für je 10 min mit 20 ml TBS-Puffer gewaschen wurde. Anschließend wurde für mindestens 1 h in 20 ml TBS mit 2 % BSA unter leichtem Schwenken inkubiert, bevor dreimal 10 min mit je 20 ml TBST gewaschen wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper, welcher 1/10000 mit TBST in einem Endvolumen von 20 ml verdünnt worden war. Nach dreimaligem Waschen mit TBST folgte eine einstündige Inkubation der Membran mit dem zweiten, Alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörper, welcher 1/10000 mit TBST-Puffer in einem Endvolumen von 20 ml verdünnt worden war. Nach erneut dreimaligem Waschen mit TBST wurde der *Western Blot* entwickelt. Dazu wurde die Membran mit einer Lösung aus 12,5 μ l NBT und 75 μ l BCIP in 20 ml AP-Puffer solange inkubiert, bis Banden zu sehen waren. Die Farbreaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit demineralisiertem Wasser abgestoppt. Zur Dokumentation des Ergebnisses wurde die Membran gescannt oder fotografiert.

3.4.6 Durchmusterung Zellulose-gebundener Peptid-Bibliotheken nach Bindern für SurA

Zur Suche nach Bindestellen für SurA in Außenmembranproteinen wurden Peptid-Bibliotheken eingesetzt. Die aus 13 Aminosäuren bestehenden, synthetisch hergestellten Peptide, die jeweils um 10 AS überlappen, deckten die gesamte Primärsequenz der Proteine LamB, OmpF und OmpA ab. Die Peptide wurden durch automatische Peptidsynthese erzeugt und sind am C-terminalen Ende über einen $(\beta\text{-Ala})_2$ Linker auf Zellulose mit einer Dichte von ca. 90 – 100 nmol/mm² verankert (Kramer *et al.*, 1993; Kramer und Schneider-Mergener, 1998; Frank, 2002). Die Durchmusterung der Bibliotheken auf SurA-Bindung wurde leicht modifiziert nach Rüdiger *et al.*, (2001) durchgeführt. Zunächst wurden die auf Zellulose verankerten Bibliotheken mit Methanol für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde dreimal jeweils für 10 min mit TBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Inkubation mit 170 nM SurA-Lösung oder SurAN+ICt fand für 1 h bei Raumtemperatur in MP-Puffer unter leichtem Schütteln statt. Nach dreimaligem Waschen der Zellulose-Membran mit TBS für 10 min bei 4° C wurden die gebundenen Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Elektrotransfer übertragen. Dazu wurden zunächst zwei Whatman-Papier Streifen, die zuvor auf die gleiche Größe wie die Zellulose-Membran zugeschnitten waren, in Kathoden-Puffer getränkt und auf die Kathode der Blot-Apparatur gelegt. Anschließend wurde die Zellulose-Membran so auf die Whatman-Papiere aufgelegt, dass die obere Seite in Richtung Anode zeigt. Die für 5 Minuten in Methanol eingelegte PVDF-Membran wurde luftblasenfrei auf die Zellulose-Membran gelegt, gefolgt von einem in Anoden-Puffer II und zwei in Anoden-Puffer I getränkten Whatman-Papieren. Die PVDF-Membranen wurden vor dem Auflegen auf die Zellulose-Membran markiert, um die Orientierung nachvollziehen zu können. In allen nachfolgenden Schritten wurde die Seite der PVDF-Membran, die während des Transfers der Zellulose-Membran zugewandt war, nach oben ausgerichtet.

Der Transfer der Proteine erfolgte bei 0,8 mA/cm² Membranfläche und einer Dauer von zunächst 40 min. Anschließend wurden vier weitere Transfer-Durchgänge durchgeführt. Nach dem zweiten Transfer wurden die Whatman-Papiere gegen entsprechend behandelte frische Whatman-Papiere ausgetauscht. Die einzelnen Transfer-Zeiten sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Transfer-Zeiten und Spannungen

Durchgangs-Zeiten	Spannung
1. Membran 40 min	ca. 75 mA (0,8 mA/cm ²)
2. Membran 30 min	ca. 75 mA (0,8 mA/cm ²) *
3. Membran 30 min	ca. 75 mA (0,8 mA/cm ²)
4. Membran 20 min	ca. 75 mA (0,8 mA/cm ²)
5. Membran 20 min	ca. 75 mA (0,8 mA/cm ²)

*Wechsel der Whatmanpapiere nach dem zweiten Durchgang

Die PVDF-Membranen wurden zweimal mit TBS-Tween für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen, und anschließend in TBS-Tween mit 3–5% Milchpulver für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Blocken wurden die PVDF-Membranen in einer Lösung aus 1. Antikörper (Anti-SurA aus Kaninchen, 1/10000 Verdünnung in TBS-Tween mit 1% Milchpulver) für 1 h bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Danach wurde dreimal mit TBS-Tween für 20 min bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend mit dem 2. Antikörper (Anti-Kaninchen, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase, 1/10000 Verdünnung in TBS-Tween) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit TBS-Tween für 10 min bei Raumtemperatur wurden die PVDF-Membranen luftblasenfrei auf eine saubere Glasplatte gelegt. Auf die PVDF-Membran wurden 0,5 – 1 ml *Enhanced chemifluorescence* (ECF)-Substrat aufgebracht und die Membranen luftblasenfrei mit einer Kopierfolie abgedeckt. Zur Entwicklung wurde für 5 – 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die PVDF-Membranen wurden anschließend mit der Oberseite nach oben auf ein trockenes Whatman-Papier gelegt und im Dunkeln für ca. 20 – 30 min getrocknet. Die trockenen PVDF-Membranen wurden auf einem STORM FluorImager eingelesen. Dazu wurden die Membranen nun mit der Oberseite nach unten auf den Glastisch des Gerätes gelegt. Eine Lage Whatman-Papier und eine Glasplatte dienten zum Andruck der Membran auf den Glastisch.

Die Alkalische Phosphatase des 2. Antikörpers setzt ECF zu einem fluoreszierenden Produkt um. Nach Anregung des Spaltproduktes durch Bestrahlung bei 450 nm wurde die Emission bei ~ 560 nm (*STORM*: Blaue Fluoreszenz/Chemifluoreszenz) vermessen.

Zur Anpassung der Lichtintensität, die beim Einlesen der Fluoreszenz nötig ist, wurde die Spannung des *Photomultiplier tube* je nach Qualität und Entwicklungszustand der Membranen zwischen 550 und 700 V gehalten. Die erhaltenen Bilder wurden mit der Software *ImageQuant* gegebenenfalls nachbearbeitet und als TIFF-Datei exportiert.

3.5 Spektroskopische Methoden

3.5.1 *Electron paramagnetic resonance* (EPR) Spektroskopie MTSSL markierter Proteine

EPR-Spektroskopie wurde zur Suche nach Peptid-Bindestellen auf der Oberfläche des SurA Moleküls herangezogen. Aufgrund der Tatsache, dass die Primärsequenz von SurA keine Cysteine aufweist, ist dieses Protein für das sogenannte *site-directed spin labeling* (SDSL) geeignet (Millhauser *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 1999; Columbus und Hubbell, 2002). Es wurden an bestimmten Positionen in SurA, die mittels der bekannten 3D-Struktur von SurA ausgewählt wurden, Cysteinreste eingeführt (3.3.5.) und an diese die Radikalsonde 1-oxyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrroline-methyl-Methanthiosulfonat (Stone *et al.*, 1965; Berliner *et al.*, 1982) über Thiol-Kopplung kovalent gebunden (Kirby *et al.*, 2004). Aufgrund des freien Elektrons am

Stickstoffatom diente die Radikalsonde (Abb. 10) als Werkzeug der *electron paramagnetic resonance* (EPR) Spektroskopie zur Untersuchung der Umgebung in einem gewissen Radius um die Sonde (Owenius *et al.*, 1999; Ikryannikova *et al.*, 2004). Für die hier angelegte Fragestellung nach einer Bindung eines Peptides in einem bestimmten Bereich um die Sonde ist die Information über den Grad der Immobilisation der Sonde entscheidend (Steinhoff, 2004). Anders ausgedrückt: im Falle einer Bindung von Peptiden in räumlicher Nähe zur Sonde ist eine verstärkte Immobilisierung der Sonde zu erwarten. Gleichzeitig kann auch durch Konformationsänderung des Proteins eine indirekte Änderung des Immobilisationsgrades verursacht werden. Daher kann Aufschluss über eine Bindung eines Substrates oder eine Konformationsänderung, verursacht durch das Substrat, gewonnen werden. Die wichtigsten Charakteristika der EPR Spektroskopie werden hier näher erörtert.

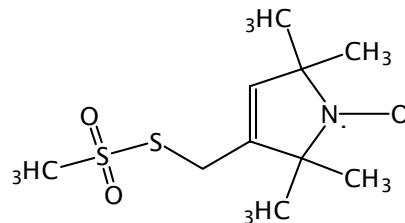


Abb. 10: Chemische Struktur von (1-oxyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrroline--methyl) Methanthiosulfonat (MTSSL). Die Radikalsonde besitzt ein freies Radikal am Stickstoffatom, welches bei der EPR Spektroskopie mit Mikrowellen Bestrahlung und einem angelegten Magnetfeld von Bereich von 3195 bis 3295 Gauß ein charakteristisches Resonanzsignal liefert.

Ähnlich wie der NMR-Spektroskopie, bei der entweder Distanzen zwischen Resten eines Makromoleküls oder zwischen einem Ligand und einer Bindungsstelle ermittelt werden, wird bei der EPR der Abstand eines bestimmten Atoms zu einem unbestimmten weiteren Atom gemessen (Freifelder, 1982). Grundsätzlich basiert das Prinzip auf einem paramagnetischen Zentrum, z.B. ein ungepaartes Elektron, das von einem fluktuierenden magnetischen Feld, erzeugt durch den ungepaarten Elektronenspin, umgeben ist. Ein Spektrum dieses Feldes verbreitert sich, wenn ein weiteres Atom in eine gewisse räumliche Nähe gelangt und dadurch das Magnetfeld beeinflusst wird (3.5.1). Das Spektrum wird bei Kontakt und/oder Änderung der Hydrophobizität sowie anderer Parameter des Umfeldes breiter und gibt somit Aufschluss über die Mobilität der Sonde, was wiederum auf den Zustand der Umgebung schließen lässt (Kirby *et al.*, 2004; Steinhoff, 2004).

Die meisten chemischen Verbindungen besitzen gepaarte Elektronen, somit ist das magnetische Nettomoment gleich null. Substanzen mit ungepaarten Elektronen sind paramagnetisch, weil sich in dem gleichen Orbital kein zweites Elektron mit entgegengesetztem Spin und somit auch entgegengesetztem magnetischem Moment befindet. Das magnetische Moment des ungepaarten Elektrons wird nicht durch das zweite Elektron neutralisiert, das ungepaarte Elektron ist paramagnetisch und mittels EPR detektierbar (Mortimer, 1973). Ein Elektron

besitzt ein magnetisches Spinnmoment, welches zwei Orientierungen, mit der Spinquantenzahl m_s , $\frac{1}{2}$, im Raum einnehmen und mit einem äußeren Magnetfeld interagieren kann (Freifelder, 1982). Ein einzelnes Elektron mit gegebenem Spin verhält sich dabei wie ein kleiner Magnet, d.h. es orientiert sich entweder parallel oder antiparallel zur Ausrichtung des Magnetfeldes. Die Resonanzbedingung, also die Energiedifferenz zwischen zwei Spin Zuständen des Elektrons in einem Magnetfeld B , lautet nach Atkins (1990):

$$\Delta E = g_e \mu_B B$$

mit g_e = g-Faktor, eine Konstante mit einem Wert von 2,00232 für ein freies Elektron (Kurad *et al.*, 2003}, μ_B = Bohrsches Magneton ($9,27408 \times 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$); B = Magnetfeld

Somit ist die Resonanzbedingung bei

$$h\nu = g_e \mu_B B$$

gegeben.

Bei Erfüllung der Resonanzbedingung findet eine verstärkte Strahlungsabsorption statt. Bei der EPR Spektroskopie wird mit einer Feldstärke gemessen, bei der die Elektronen in Resonanz mit monochromatischer Strahlung kommen (Atkins, 1990). Es wird dazu ein Magnetfeld im Bereich von ca. 3000 Gauß angelegt und die Resonanz mit elektromagnetischer Strahlung der Frequenz von ca. 9 GHz (Wellenlänge von 3 cm) induziert. Diese Frequenz gehört zum so genannten X-Band des Mikrowellenbereiches. Ein EPR Spektrum wird erzeugt, indem man die Mikrowellen-Absorption bei einer Änderung des Magnetfeldes detektiert. Das Signal der Absorption wird jedoch noch verändert, denn das resultierende Spektrum wird als die 1. Ableitung der Absorption nach der Feldstärke ausgegeben (Abb. 11).

Man betrachtet nun die Anordnung der hier verwendeten Radikalsonde am Stickstoffkern. Es handelt sich hierbei um ein Radikal mit einem ungepaarten $2p$ π -Orbital Elektron. Beim ^{14}N -Kern (Konfiguration: $1s^2 2s^2 2p_x^1 2p_y^1 2p_z^1$) mit der Spinquantenzahl $I = 1$ sind drei Spinorientierungen erlaubt und ein Spektrum wird in drei Linien gleicher Intensität aufgespalten, da jede dieser drei Orientierungen von $\frac{1}{3}$ der Radikale einer Probe besetzt wird. Die drei p -Orbitale im Stickstoff, die je ein Elektron beherbergen sind jedoch energetisch identisch und nur durch das Anlegen eines äußeren magnetischen Feldes werden bestimmte Resonanzlinien in mehrere Linien aufgespalten (Mortimer, 1973). Diese Erscheinung wird als Zeemann-Effekt bezeichnet und für Stickstoff ($I = 1$) sind drei Zustände beschrieben, der mit $m_l = +1$ wird um $\mu_B B$ angehoben, der mit $m_l = 0$ bleibt unverändert und der mit $m_l = -1$ wird um $\mu_B B$ erniedrigt (m_l = magnetisches Bahnmoment, μ_B = Bohrsches Magneton; B = Magnetfeld). Es kommt zur Hyperfeinaufspaltung, also zur Aufspaltung einzelner Resonanzlinien in mehrere Komponenten (Atkins, 1990), die generell für Kerne mit der Spinquantenzahl = I zu einer Aufspaltung des

EPR-Spektrums in $2I+1$ Hyperfeinstruktur-Linien gleicher Intensität führt (Cantor und Schimmel, 1980; Freifelder, 1982). Diese Aufspaltung wird durch die Anzahl möglicher Orientierungen der magnetischen Momente des Atomkerns bestimmt.

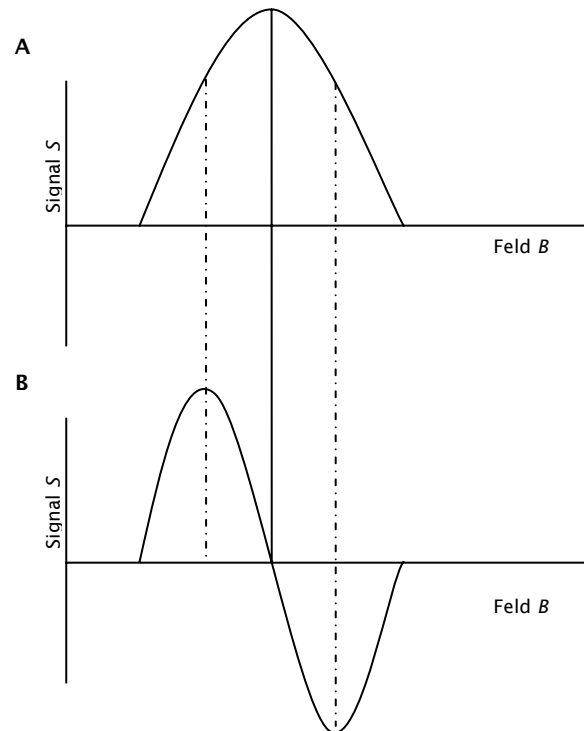


Abb. 11: (A): Registrierung des Absorptionssignal S bei einem angelegten magnetischen Feld B . (B): Die 1. Ableitung der Absorption nach der magnetischen Feldstärke liefert das endgültige Spektrum; (Modifiziert nach Atkins, 1990).

Zwei wichtige Faktoren haben Einfluss auf den Verlauf eines EPR-Spektrums. Der bereits erwähnte g -Faktor ist ein Proportionalitätsfaktor, ein sogenannter Tensor (g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}), der oft orientierungsabhängig, sprich anisotrop ist. Der Wert hängt von der Elektronenkonfiguration des untersuchten Radikals ab und liegt bei einem freien Elektron bei 2,0023. Weiterhin ist die Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons und des Kernspins als Hyperfeinaufspaltung zu berücksichtigen. Dieses geschieht durch die Verwendung eines weiteren Tensors, A , der die anisotrope Hyperfein-Wechselwirkung beschreibt. Ein EPR-Spektrum kann nun näherungsweise durch den Hamilton-Operator quantitativ beschrieben werden (Hoppe *et al.*, 1982):

$$H = |\beta| \cdot SgH_0 + bSII$$

mit S , I und H_0 als Vektoren des Elektronenspins (S), des Kernspins (I) und des äußeren Magnetfeldes (H_0). Desweiteren mit g als Tensor des g -Faktors und b als Planck Konstante, β als Bohrsches Magneton. Der g -Faktor wie auch der A -Tensor sind nun äußerst empfindlich bezüglich der gegenseitigen Orientierung des Magnetfeldes und des $2p \pi$ -Orbitals (Hoppe *et al.*,

1982). Das freie, ungepaarte Elektron ist in Nitroxid-Radikalsonden im $2p$ π_z -Orbital lokalisiert (Wegener, 2000; Kurad *et al.*, 2003). Im Falle einer senkrechten Orientierung des Magnetfeldes H_0 zur Längsachse der Sonde und damit auch zur z -Achse des $2p$ π -Orbitals ist ein Spektrum zu erhalten, das eine völlige Mobilität des Elektrons zeigt (Abb. 12B), während bei einer parallelen Ausrichtung des Magnetfeldes zur z -Achse des $2p$ π -Orbitals ein immobilisierter Zustand vorherrscht (Abb. 12A). Die Spektren zeigen Extremfälle der völligen Immobilisierung, durch einen Signalverlauf mit verbreiterten *peaks* charakterisiert, und der sehr schnellen Rotation, durch ein scharfes Triplettspektrum gekennzeichnet (Hoppe *et al.*, 1982).

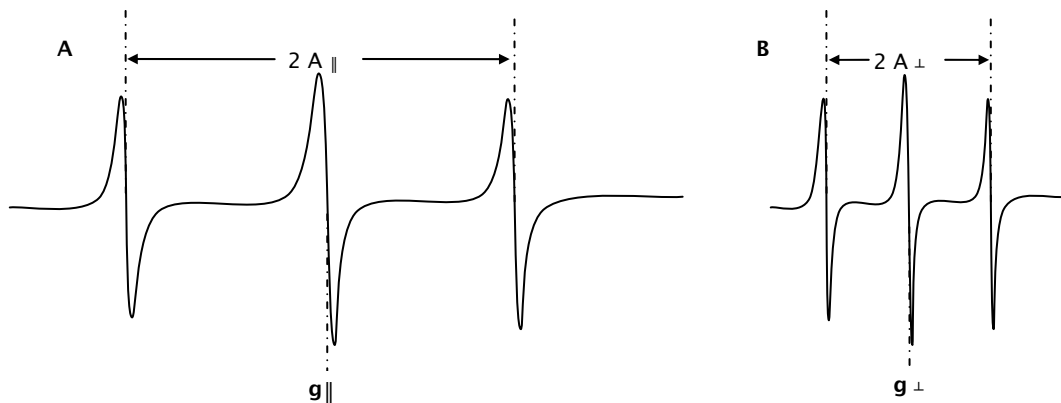


Abb. 12: Schematische Darstellung der Anisotropie des EPR-Spektrums einer Nitroxid-Radikalsonde. Bei Veränderungen (Polarität des Lösungsmittels, pH, Interaktionen mit benachbarten Atomen) der Umgebung steigt der Beitrag der anisotropen Hyperfein-Wechselwirkung (\mathcal{A} -Tensor) was verbreiterte Spektralbanden verursacht (A). In diesem Fall der völligen Immobilisierung ist das Magnetfeld parallel ($H_0 \parallel$) zur z -Achse des $2p$ π -Orbitals ausgerichtet. Sind die, die Radikalsonde umgebenden Einflüsse und somit die des \mathcal{A} -Tensors sehr gering, ist das Magnetfeld senkrecht ($H_0 \perp$) zur z -Achse des $2p$ π -Orbitals orientiert (B); (Modifiziert nach Hoppe *et al.*, 1982).

Die Wechselwirkung aus der Umgebung, die solche Veränderungen des \mathcal{A} -Tensors und somit des Spektrums hervorrufen, sind u.a. durch Faktoren wiedergegeben. Diese Faktoren sind im \mathcal{A} -Tensor, der von anisotropen Hyperfein-Wechselwirkungen bestimmt wird, enthalten. Als entscheidende Einflüsse sind Viskosität des umgebenden Mediums, der pH-Wert, die Interaktion mit benachbarten Seitenketten und die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen speziell durch die anisotropen Hyperfein-Wechselwirkungen berücksichtigt, festzuhalten (Wegener *et al.*, 2000; Hammarström *et al.*, 2001; Kurad *et al.*, 2003; Ikryannikova *et al.*, 2004; Steinhoff, 2004). Mit der Methode der positionsspezifischen Radikalsonde steht ein potentes Werkzeug zur Verfügung, mit dem über die Mobilität der Nitroxid-Seitenkette ortstypische Informationen über Bindungen oder Konformationsänderungen gewonnen werden können (Wegener *et al.*, 2000; 2001). Man erhält Informationen über die Beschaffenheit, die Sekundär- und Tertiärstruktur der nahe gelegenen Umgebung zur Bindungsstelle der Radikalsonde (Pfeiffer *et al.*, 1999).

3.5.2 Modifikationen von SurA-Cys-Proteinen mit der Radikalsonde MTSSL

3.5.2.1 Kopplung von MTSSL an immobilisierte SurA-Cys-Proteine

An Nickel-Sepharose immobilisierte SurA-Cys-Proteine wurden mit 1 mM (1-oxyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrroline-methyl) Methanthiosulfonat (MTSSL) in Puffer A (pH 6,7) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 250 ml 10 mM Imidazol in Puffer A gewaschen (IMAC, 3.4.4.1; modifiziert nach Kweon *et al.*, 2003). Dabei reagiert die SH-Gruppe des Cysteins mit MTSSL und bildet eine kovalente Disulfidbrücke aus, die allerdings eine reversible Bindung darstellt.

Die weitere Reinigung der markierten Proteine erfolgte nach Protokoll (3.4.4.1). Nach der IMAC wurden die proteinhaltigen Fraktionen bis auf ca. 500 µl konzentriert und über Gelfiltration (Superdex 75, 10/30 oder 200 16/60, Pharmacia) erneut gereinigt (3.4.4.3 und 3.4.4.2). SurA-Cys-Proteine, die eine hohe Tendenz zur Dimerbildung durch Disulfidbrückenbildung aufwiesen, wurden auf der IMAC-Säule mit 5 mM DTT in Puffer A (pH 6,7) für 1 h bei Raumtemperatur reduziert, mit 50 ml Puffer A (pH 6,7) gewaschen und anschließend, wie oben beschrieben, mit MTSSL inkubiert.

3.5.2.2 Messung des Immobilisationsgrades von MTSSL in SurA-Cys-Proteinen

Das gereinigte und mit MTSSL gekoppelte SurA-Protein wurde in eine Glaskapillare durch den Kapillareffekt aufgesaugt, so dass die Kapillare mit ca. 25 – 40 µl der Proteinlösung gefüllt war.

Die Kapillare wurde mit einem Bunsenbrenner an dem distalen Ende zur Proteinprobe erhitzt und versiegelt. Anschließend wurde die Kapillare behutsam in ein Quarz-Röhrchen befördert und durch kurzes und vorsichtiges Schütteln auf den Boden des Röhrchens gebracht. Dieses wurde in den Probenraum des EPR-Gerätes so eingesetzt, dass die Spitze des Röhrchens mit der Probe genau in der Mitte des ca. 3 cm hohen Messbereiches justiert war. Die Messungen wurden auf einem Varion X-Band EPR Spektrometer bei 21 °C mit Mikrowellenstrahlung von 9,118 GHz bei 5 bis max. 20 mW durchgeführt. Das angelegte magnetische Feld reichte von 3195 bis 3295 Gauß. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Werte gemittelt. Die erhaltenen Spektren wurden mit der Software IGOR analysiert und in Dateien mit TIFF-Format exportiert.

3.5.3 Surface plasmon resonance (SPR) Spektroskopie

Die SPR Spektroskopie im BIAcore-System dient generell zur Echtzeit-Analyse von Interaktionen zwischen Molekülen (Karlsson und Fälth, 1997; Fivash *et al.*, 1998; Rich und Myszka, 2002). Mit dieser Methode wurde die Interaktion von SurA-Proteinen mit Peptiden analysiert. Die Komplexbildung von SurA-Proteinen mit Peptiden führt zu einer Massenzunahme, was mit dieser Methode gemessen wird.

Das Prinzip der SPR-Technologie beruht auf dem optisch-physikalischen SPR-Phänomen (Kretschmann und Raether, 1967), das an der Grenzfläche von zwei transparenten Medien, z.B. Glas und Wasser, mit unterschiedlichen Brechungsindizes auftritt. Licht, aus dem Medium mit höherem Brechungsindex, wird an der Grenzfläche teilweise reflektiert und teilweise gebrochen. Bei einem bestimmten Einfallswinkel wird kein Licht mehr gebrochen und es kommt zur Totalreflexion an der Grenzfläche zwischen den beiden Medien (Harrick, 1967). Dennoch dringt dabei eine elektromagnetische Komponente, die *evanescent wave*, mit einer Tiefe von einer Wellenlänge in das Medium mit dem geringeren Brechungsindex ein (Abb. 13).

Ist an der Grenzfläche zwischen den beiden Medien eine dünne Metallschicht aufgebracht und das Licht monochromatisch und p-polarisiert, wodurch die elektrische Vektor-Komponente parallel zur Einfallsebene orientiert ist, wird die Intensität des reflektierten Lichts bei einem bestimmten Einfallswinkel, dem SPR-Winkel, deutlich reduziert. Dabei wird durch die Interaktion der *evanescent wave* mit delokalisierten OberflächenElektronen in dem Metallfilm an der Grenzfläche mit dem Medium die SPR hervorgerufen. Durch diese Interaktion wird eine kollektiv mitschwingende Oszillation der Elektronen oder *Plasmons* angeregt. Dieses SPR-Phänomen führt zu einem „Schatten“, einem lichtärmeren Bereich im reflektierten Licht, der auf einer Lichtdetektions-Einheit gemessen werden kann. Der Grad des SPR-Winkels hängt von verschiedenen Faktoren ab, so z.B. vom Brechungsindex des auf der nicht angestrahlten Seite der Oberfläche befindlichen Mediums, in das die *evanescent wave* eindringt (Sjölander und Urbaniczky, 1991).

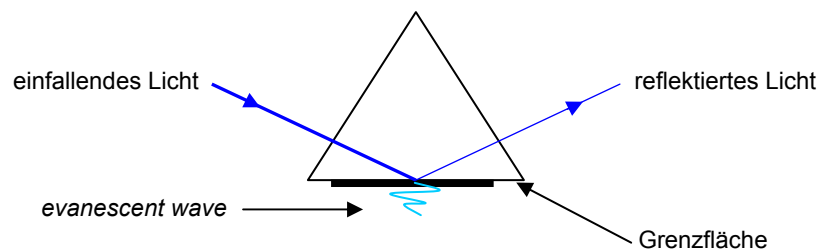


Abb. 13: Grundlegendes Prinzip der SPR-Technologie. Unter Bedingungen einer Totalreflexion an einer metallbeschichteten Grenzfläche dringt die *evanescent wave* in das Medium ein, welches einen geringeren Brechungsindex besitzt.

Der Brechungsindex des Mediums ist seinerseits von der Konzentration von Molekülen an der Oberfläche abhängig. In einem Biacore-Instrument findet die Interaktion zwischen freien und immobilisierten Molekülen auf der Oberfläche eines Sensor-Chips statt. Daher ist die Echtzeit-Messung des SPR-Winkels als ein Maß der Oberflächenkonzentration zu betrachten, da die anderen Faktoren, wie die Eigenschaften des Metall-Films (Optische Konstante, Dicke und Gleichmäßigkeit) und die Wellenlänge des auftreffenden Lichts, konstant sind. Somit dient SPR zur Untersuchung des Brechungsindex der wässrigen Schicht in unmittelbarer Nähe der Metalloberfläche. Die Entfernung vom Metallfilm, die so erfasst wird, hängt davon ab, wie weit

die *evanescent wave* in die Lösung eindringt. Dabei nimmt die Welle exponentiell mit der Entfernung vom Metallfilm ab, wobei die Tiefe dieses Eindringens gewöhnlich als die Distanz, in der die Welle zerfällt, definiert ist. Somit ist die Strecke ca. 37 % der Stärke an der Oberfläche, also etwa 300 nm bei BIAcore Geräten, da diese mit Dioden, die nahe dem Infrarot Bereich emittieren, ausgestattet sind. Graphisch wird eine Änderung der Molekülkonzentration an der Matrix des Sensor-Chip durch ein so genanntes Sensorgramm dargestellt, bei dem das SPR-Signal als Maß des SPR-Winkels gegen die Zeit aufgetragen wird und somit eine direkte Messung der absoluten Oberflächenkonzentration ermöglicht (Jönsson *et al.*, 1991; Stenberg *et al.*, 1991). Dabei entspricht 1 *Response Unit* (RU) der Änderung von 1pg/mm² der Oberflächenkonzentration.

Der Sensor-Chip besteht aus einem Glasplättchen, welches mit einem dünnen Goldfilm beschichtet ist (Abb. 14). Dieser inerte Goldfilm ist mit einer kovalent gebundenen Matrix aus Dextran bedeckt. Letzteres ist ein lineares Polymer aus Glukose-Einheiten. Diese Einheiten sind beim C1-Sensor-Chip carboxymethyliert, um funktionale Gruppen für verschiedene chemische Kopplungen zur Verfügung zu stellen (Johnsson *et al.*, 1991). Durch die Carboxyl-Gruppen besitzt die Matrix unter physiologischen Bedingungen eine negative Ladung. Die Seite des Sensor-Chips, die die Matrix beherbergt, ist einem Flusskanal zugewandt (Abb. 14). Die andere Seite des Sensor-Chips befindet sich direkt an einer Detektionseinheit, über die das SPR-Signal registriert wird.

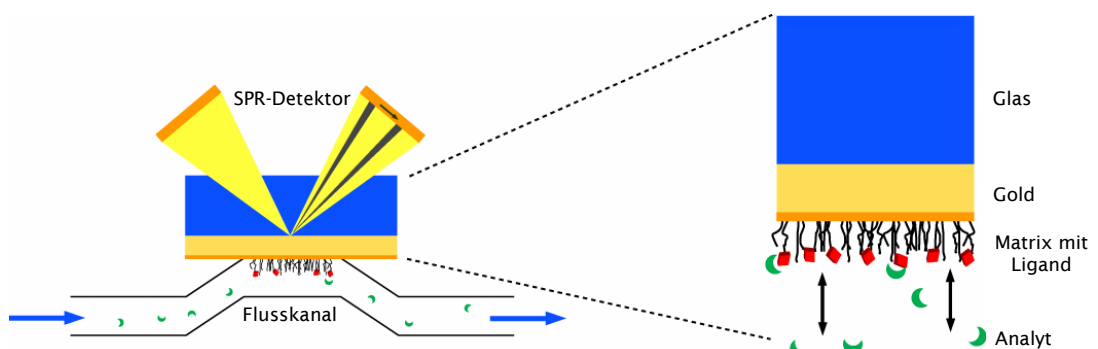


Abb. 14: Darstellung der SPR-Detektionseinheit und eines Sensor-Chip im Querschnitt. (A) Aufbau der SPR-Detektionseinheit, die direkt an die Glasseite des Chips angelagert ist. Die über den Flusskanal zugeführten, an die Liganden (rot) bindenden Analyt-Moleküle (grün) führen zu einer Massezunahme, die wiederum eine Änderung des Brechungsindex des Mediums und des somit SPR-Winkels bewirkt. (B) Glasträger, Goldschicht und eine Dextran-Oberflächenmatrix, die immobilisierte Liganden beherbergt, sind die Bestandteile eines Sensor-Chips.

Eine der beiden zur Bindung beitragenden Komponenten (Ligand) wird auf der Oberfläche eines Sensor-Chips immobilisiert, während sich die zweite Komponente (Analyt) in Lösung in einem kontinuierlichen Fluss über den Sensor-Chip befindet. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Peptiden aus der LamB Bibliothek und SurAN+ICt analysiert. Da hier die Zunahme der Masse an der Oberfläche des Sensor-Chips detektiert wird (Christensen, 1997;

Myszka *et al.*, 1998), sollte das größere Molekül als Analyt eingesetzt werden. Im Falle einer Bindung von SurAN+ICt an die verankerten Peptide wäre die Zunahme der Masse und somit die Änderung des Brechungsindex größer als bei einer umgekehrten Anordnung. Da SurAN+ICt ein deutlich höheres Molekulargewicht (M_r 37 000) als die Peptide (M_r 2000) besitzt, wurden die Peptide auf einen C1-Sensor-Chip immobilisiert werden, während SurAN+ICt als Analyt injiziert wurde.

3.5.3.1 Immobilisierung von Peptiden auf der Oberfläche eines Sensor-Chips C1

Die Peptide 46 und 71 wurden auf der Oberfläche eines C1-Sensor-Chips nach Herstellerangaben gekoppelt. Der Laufpuffer war TBS-Tween und die Flußrate betrug 5 μ l/min. Dabei wurde darauf geachtet, ein etwa äquimolares Verhältnis beider Peptide zu immobilisieren und eher mehr vom Peptid 71 zu koppeln. Die Peptide wurden mit einem zusätzlichen C-terminalen-Cystein synthetisiert, um die gleiche Orientierung wie auf der Peptid-Bibliothek gewährleisten zu können. Ein weiterer Vorteil dieses Disulfid-Kopplungssystems ist die Wiederverwertbarkeit, da die Disulfid-Bindungen reversibel sind und mit reduzierenden Agenzien, beispielsweise DTT, gelöst werden können.

Zur Kopplung wurden zunächst die Carboxyl-Gruppen auf der Oberfläche des C1-Sensor Chips mittels 0,05 M N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 0,2 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodimid (EDC) aktiviert und anschließend 80 mM 2-(2-pyridinyldithio)Ethanamin (PDEA, Thiol-Kopplungs Reagent) über die aktivierten N-Hydroxysuccinimid-Esterreste eingeführt. Durch Zugabe des Liganden, einem Peptid mit einer C-terminalen Thiol-Gruppe, kommt es zum Austausch zwischen dem Disulfid des PDEA mit dem Liganden. Dabei wurde ein Kopplungspuffer mit einem pH gewählt, der etwas unter dem Isoelektrischen Punkt des Peptides (pH 4.1) liegt. Dadurch wird verhindert, dass eine mögliche negative Ladung des Peptides die Abstoßung von der ebenfalls negativ geladenen Matrix verursacht.

Noch auf der Oberfläche verbliebene PDEA-Disulfide, die nicht gegen den Ligand ausgetauscht waren, wurden mit L-Cystein-Lösung, abgesättigt. Die genaue Injektionsdauer und verwendeten Mengen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Für die praktische Anwendung wurde CMD-Skripte verfasst (Anhang), die einen automatisierten Ablauf ermöglichten.

Tabelle 4: Mengenangaben zum Ablauf der Thiol-Kopplung

	Thiol-Kopplung	Substanz	Injektionsmenge [μ l]
1	Aktivierung	0,2 M EDC/0,05 M	10
2	Einführung Disulfide	80 mM PDEA	15
3	Kopplung Ligand	Ligand	mind. 5
4	Deaktivierung	50 mM Cystein	15

Die Menge an Peptid, die gekoppelt werden sollte, richtete sich nach den Anforderungen des Experimentes, speziell nach der Masse des Bindungspartners. Entscheidend ist dabei, wie viel Bindungsstellen für den Analyten vom Liganden zur Verfügung gestellt werden müssen, um ein adäquates SPR-Signal zu erzielen. Vom Hersteller wird zur Messung von Kinetiken ein R_{\max} Wert (Response Units, bei dem alle Liganden mit Analyt besetzt sind) von 100 RU empfohlen. Die zu koppelnde Menge an Peptid, um bei Bindung mit dem Protein 100 RU zu erhalten, wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$R_{\max} = \left(\frac{\text{Analyt } M_r}{\text{Ligand } M_r} \right) \times \text{Ligand RU} \times \text{Valenz}$$

M_r (Analyt = SurAN+ICt) \sim 37.000, M_r (Ligand = Peptid) \sim 2000, Ligand RU entspricht der auf den Chip zukoppelnden Peptid-Menge in RU. Die Valenz (Anzahl der Analyt-Moleküle, die von dem Liganden gebunden werden können) wurde mit 1 angenommen, wobei die Bindungsstöchiometrie zwischen SurA und dem Peptid nicht bekannt ist.

Es wurde die Menge an zu koppelndem Peptid gesucht, die für alle SurA-Varianten ein ausreichendes Signal bei Interaktion mit den Peptiden (R_{\max} von 100 RU vom Hersteller empfohlen) ergab. Für SurA-Proteine lag diese, je nach R_{\max} -Wert, bei 2–10 RU (Tabelle 5).

Tabelle 5: Menge an zu koppelndem Peptid und jeweilige R_{\max} bei Bindung mit SurA

Beispiel Berechnung für Peptid 46 (mit Biotin), M_r 2053,3			
SurA wt: (M_r Analyt/ M_r Ligand) = 22,47		SurAN+ICt: (M_r Analyt/ M_r Ligand) = 17,97	
R_{\max}	RU Ligand	R_{\max}	RU Ligand
100	2,3 RU	100	5,7 RU
113,5	5 RU	89,85	5 RU
179,7	8 RU	142,8	8 RU

Da 1 ng Peptid/mm² einer Änderung von 1000 Response Units (RU) entspricht, wurde die Anzahl der zu immobilisierenden Liganden nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Anzahl Liganden (pmol/mm}^2\text{)} = \left(\frac{\text{Ligand RU}}{\text{Ligand } M_r} \right) \times \text{Valenz}$$

Dabei sind Ligand M_r und Valenz bekannt bzw. angenommen und Ligand RU aus Tabelle 5 zu entnehmen. Zur Ermittlung der tatsächlichen Menge an immobilisierten Peptiden wurde die Differenz der Basislinien vor und nach der Kopplungsreaktion herangezogen.

3.5.3.2 SPR-Interaktionsanalyse von SurAN+ICt mit ausgewählten Peptiden

Als Laufpuffer bei Bindungsstudien wurde generell TBS-Tween (pH 7,6) verwendet. Die

Flußrate wurde zwischen 15 und 25 µl/min gehalten, zu Kontrollexperimenten (Goldstein *et al.*, 1999) aber auch bis zu 75 µl/min eingestellt. Das SurAN+ICt Protein (Ligand) wurde in die Flusszelle des Sensorchips mit den gekoppelten Peptiden (Ligand) injiziert. Der Analyt ist somit in einem zeitlich begrenzten Abschnitt in Lösung über der Chip-Oberfläche und kann mit dem Ligand interagieren. Die durch Bindung des Analyten an den Liganden verursachte Änderung der Masse wurde als Sensorgramm-Kurve verzeichnet. Nach jeder Messung wurde die Oberfläche des Chips durch Injektion einer 1–3 M NaCl-Lösung regeneriert, d.h. vollständig vom Analyt befreit.

Besonders der K_{on} (k_a) und der K_{off} (k_d) Bereich der Bindungskurve sind interessant, da daraus die Kinetik der Bindung abgeleitet werden kann. Die Gleichgewichtskonstante, K_D , gibt die Konzentration von freien ($[A][B]$) zu gebundenen ($[AB]$) Molekülen an (Formel 1). Je kleiner K_D , desto größer ist die Affinität der Bindung.

$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]} \rightarrow K_D = \frac{[k_d]}{[k_a]} \quad \text{Formel 1}$$

mit

$$[A][B]/[AB] = k_d/k_a [M]$$

Die erhaltenen Sensorgramme wurden mit der *BIAevaluation* Software ausgewertet, um die Gleichgewichts-Konstante zu ermitteln. Die Sensorgramm Kurven wurden dabei mit Idealkurven, die zur Berechnung der K_D herangezogen wurde, abgeglichen. Die Abweichung wurde als χ^2 Wert ausgegeben und gilt als Maß für Genauigkeit, mit der die Kurven ausgelesen wurden.

3.5.4 Fluoreszenzspektroskopie

3.5.4.1 Studien zur Spezifität und Affinität der Interaktion zwischen Peptid und Protein mit extrinsischer Fluoreszenz

Mit dieser Methode wurde die Komplexbildung von SurA-Proteinen mit Peptiden untersucht. Dazu wurde ein fluoreszenzmarkiertes Peptid eingesetzt. Nach Anregung bei einer für das betreffende Fluorophor typischen Wellenlänge wird bei einer energieärmeren Wellenlänge eine Emission beobachtet, welche als Fluoreszenz bezeichnet wird. Wird ein Fluorophor an ein zu untersuchendes Molekül angeheftet, sei es durch chemische Kopplung oder einfach durch Interaktion, spricht man von extrinsischer Fluoreszenz.

Die Quantenausbeute Q oder auch Fluoreszenzintensität kann generell mittels folgender Formel ausgedrückt werden:

$$Q = \frac{\text{emittierte Photonen}}{\text{absorbierte Photonen}}$$

Fluorophore wie 1-Anilino-Naphtalen-Sulphonat (ANS) besitzen in wässriger Lösung eine relativ geringe Fluoreszenz (Freifelder, 1982). Diese Eigenschaft macht sie für Bindungsstudien interessant, da die Quantenausbeute durch Überführen des Fluorophors in eine weniger polare Umgebung drastisch ansteigt. Dieses geschieht beispielsweise bei der Interaktion zweier Proteine, bei der Wassermoleküle abgestreift werden, so dass die Umgebung der Bindungsstelle weniger polar wird. Daher ist die extrinsische Fluoreszenz zur Untersuchung der Bindung ANS-markierter Peptide an SurA geeignet. Eine Zunahme von Q zeigt eine Bindung des ANS-markierten Peptides an das Protein. Bei spezifischer Bindung kann das markierte Peptid durch Konkurrenz mit einem unmarkierten Peptid gleicher Aminosäuresequenz verdrängt werden (Freifelder, 1982). Das Verdrängen des gebundenen, markierten Peptides würde einen Abfall der Quantenausbeute nach sich ziehen, was als *quenching* bezeichnet wird. Diese Methode wurde mit dem ANS-Derivat 2-(4-iodoacetamido) Anilino-Naphtalen-6-Sulfonsäure (IAANS) für Studien zur Spezifität- und Affinität der SurA-Peptid-Interaktionen eingesetzt (McCarty *et al.*, 1996).

Die Komplexbildung von SurA und SurAN+ICt mit Peptiden wurde unter Verwendung des fluoreszenzmarkierten Peptides 46* (LamB-Bibliothek) untersucht. Verschiedene Konzentrationen (100 nM bzw. 400 nM) dieses mit IAANS-markierten Peptides wurden dazu bei 30 °C für 1 h mit SurA bzw. SurAN+ICt in Konzentrationen von 100 nM bis 25 µM in F-Puffer inkubiert.

Für Konkurrenzstudien wurden 100 nM oder 400 nM unmarkierte Peptide mit zuvor hergestellten SurA/Peptid 46* Komplexen für 1 h bei 30 °C inkubiert. Das Spektrum der Fluoreszenz-Emission wurde im Bereich 350 bis 600 nm aufgenommen, die Anregung fand bei 335 nm statt. Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante wurde SurA und SurAN+ICt in ansteigenden Protein-Konzentrationen von 100 nM bis 25 µM und konstanten 100 nM Peptid 46* eingesetzt. Die Fluoreszenz bei einem Emissionsmaximum von 450 nm wurde gegen die Konzentration des Proteins aufgetragen, die erhaltene Kurve mittels GRAFIT Version 5.0.1 extrapoliert und die Gleichgewichtskonstante ermittelt (Patzelt *et al.*, 2001):

3.5.5 Bestimmung der Chaperonaktivität von SurA mittels Analyse der thermalen Aggregation von Citrat-Synthase

Die Fähigkeit un- oder fehlgefaltete Proteine zu binden und somit die Aggregation zu verhindern, ist eine Funktion molekularer Chaperone. Eine Methode zur Messung der Chaperonaktivität von Proteinen beruht auf ihrer Fähigkeit, die thermale Aggregation von Citrat-Synthase (CS), einem nicht nativen Substrat von SurA, zu unterdrücken (Buchner *et al.*, 1998). Diese Methode wurde bereits zum Nachweis der Chaperonaktivität von SurA herangezogen (Behrens *et al.*, 2001). Citrat-Synthase ist ein mitochondriales Enzym, das aus zwei identischen Untereinheiten (Mr 48 969) besteht. Es ist im Citratzyklus an der Katalyse zur

Bildung von Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA beteiligt. Bei einer Temperatur von 43 °C und in Abwesenheit ihrer Substrate, verändert Citrat-Synthase ihre Struktur, was letztendlich zur Inaktivierung und Aggregation führt. Dieser Prozess kann spektroskopisch verfolgt werden. Dabei führt die Akkumulation von Aggregaten zu einer Erhöhung der Lichtstreuung, was den Verlauf des Aggregationsprozesses wiedergibt. In Anwesenheit von SurA wird diese Aggregation unterdrückt, was die Chaperonaktivität widerspiegelt.

Vom Hersteller wurde die Citrat Synthase als Ammoniumsulfat-Suspension geliefert. Diese wurde über Nacht bei 4 °C gegen TE-Puffer dialysiert. Anschließend wurde das Enzym auf eine Endkonzentration von 17 mg/ml eingengt (3.4.4.3.) und ausgefallenes Protein mittels Zentrifugation für 30 min bei 13.000 U/min und 4 °C entfernt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Absorption bei 280 nm gemessen und mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 1.78 \text{ (mg/ml} \times \text{cm)}$ verrechnet. Aliquots dieser Proteinlösung wurden bei -20 °C gelagert und mit TE-Puffer vor Gebrauch auf eine Konzentration von 30 μM Citrat-Synthase eingestellt.

Zur Messung wurde das Fluoreszenz-Spektrophotometer (Hitachi F-4500) wie folgt eingestellt:

Programm: *time scan*

Excitationswellenlänge: 500 nm; Emmissionswellenlänge: 500 nm

Excitationsspalt: 2.5 nm; Emmissionsspalt: 2.5 nm

Meßfrequenz: 0.5 s; Meßdauer: 1200 s; Thermostat-Temperatur: 43 °C; Rührer Stellung: 6

Die Citrat-Synthase Konzentration im Meßansatz betrug 0,15 μM , die eingesetzte SurA- bzw. BSA-Konzentration 1,2 μM . Das Gesamtvolumen eines Meßansatzes betrug 1000 μl , die verwendeten Puffer wurden bei 43 °C vorgewärmt. Beispiele für die Zusammensetzung eines Meßansatzes sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Auflistung der einzusetzenden Lösungen für einen 1 ml-Ansatz:

	Hepes Puffer	Puffer A [μl]	Protein [μl]	Endkonzentration Protein [μM]
SurA wt	845,00	x	y	1,20
Kontrolle	845,00	150,00	-	0
BSA	845,00	x	y	1,20

Alle Meßansätze enthielten gleiche Grundvolumina an Hepes-Puffer (845 μl) und Puffer A (150 μl). Es wurde soviel in Puffer A befindliches Protein (y) eingesetzt, dass eine Endkonzentration von 1,2 μM erreicht wurde. Die Protein-Lösung (y) wurde gegebenenfalls mit Puffer A (x) verdünnt, wobei das Grundvolumen von 150 μl eingehalten wurde. Nachdem die Komponenten in der Meßküvette zusammen gemischt waren, wurde die Messung unter ständigem Rühren

durch *time scan* gestartet und nach Erhalt einer konstanten Basislinie nach 1 min 5 μ l Citrat Synthase zugegeben. Die aufgezeichneten Aggregationskurven wurden in das *asp*-Format konvertiert. Die Basislinie aller Messungen wurden angeglichen, um Vergleichsmöglichkeiten zwischen den verschiedenen Kurven zu gewährleisten.

3.5.5.1 Überprüfung der SurA-Präparation auf Proteaseaktivität

In Anwesenheit von Proteasen kann durch den Abbau von Citrat-Synthase eine gehemmte Aggregation vorgetäuscht werden. Die Citrat-Synthase würde degradiert und die Lichtstreuung würde, genau wie in Gegenwart von SurA, nicht ansteigen. Um sicherzustellen, dass das gereinigte SurA nicht mit proteolytisch aktiven Proteinen kontaminiert ist, wurde ein Chaperonaktivitäts-Experiment durchgeführt und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben aus dem Versuchsansatz entnommen. Die Proben (20 μ l) wurden nach 1, 5, 10, 15 und 20 min entnommen und im 15%-igen SDS-PAGE analysiert. Die Proteine wurden mit Silberfärbung detektiert. Vorhandene Proteaseaktivität in der SurA-Präparation wäre am Abbau der Citrat Synthase erkennbar.

3.6 Statistische Analysen

3.6.1 Auswertung von Fluorogrammen mit *Scion*

Die als TIFF-Dateien vorliegenden Fluorogramme der Peptid-Bibliotheken wurden zunächst mit *Scion Image* bearbeitet und ein Gitter über die Bilder gelegt, welches jeden Punkt der Peptid-Bibliothek von dem Nachbarpunkt abgrenzt. Die Intensität der einzelnen Punkte wurde mit der Einstellung „maximale Intensität“ ermittelt. Als Hintergrund wurden solche Bereiche der Bibliothek verwendet, die keine Peptide enthielten. Von den Werten der Intensitäten wurde der Hintergrundwert der entsprechenden Bibliothek subtrahiert. So wurden relative Werte für die Intensität eines jedes Punktes erhalten. Diese Werte wurden gegen den höchsten Wert jeder Bibliothek normiert. Der Punkt mit höchster Intensität wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte entsprechend daraus berechnet.

3.6.2 Klassifizierung der Peptide nach relativer Intensität

Die relativen Intensitäten der einzelnen Peptid-Punkte jeder Bibliothek wurden aufsteigend geordnet und somit eine Reihenfolge der relativen Affinitäten der einzelnen Peptide zu SurA festgelegt. Alle Peptide wurden in drei Klassen eingeteilt, um eine intensivere Analyse vornehmen zu können und Unterschiede zwischen Bindern und Nichtbindern hervorzuheben (in Anlehnung an Rüdiger *et al.*, 1997; Patzelt *et al.*, 2001; 2001). Die Klasse der guten Binder umfasste Peptide mit relativer Intensität ≥ 60 %, die Klasse der schwachen Binder Peptide mit relativer Intensität ≥ 40 % und die Klasse der Nichtbinder Peptide mit relativer Intensität

< 40 %.

3.6.3 Auswertung der klassifizierten Peptide

Die relativen Häufigkeiten jeder Aminosäure in klassifizierten Peptiden wurde ausgezählt und gegen die Häufigkeiten der Aminosäuren in der gesamten Bibliothek (=100 %) normiert.

Die statistische Signifikanz der Unterschiede (χ^2 -Wert) zwischen den Häufigkeiten der Aminosäuren der Klasse I (starke Binder), Klasse II (schwache Binder)-und Klasse III (Nicht-Binder)-Peptide wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\chi^2 = \sum \left(\frac{(O - E)^2}{E} \right)$$

Mit O = beobachteter Wert, E = erwarteter Wert, wird wie folgt errechnet:

$$E_{\text{Binder}} = \frac{4888 (\text{Aminosäuren der Bibliothek}) \times 78 (\text{Peptide Binder})}{376 (\text{Peptide der Bibliothek})}$$

$$E_{\text{Nicht-Binder}} = \frac{4888 (\text{Aminosäuren der Bibliothek}) \times 298 (\text{Peptide Nicht - Binder})}{376 (\text{Peptide der Bibliothek})}$$

Die χ^2 -Werte wurden durch Eingabe der Werte für $E_{\text{Binder}}/O_{\text{Binder}}$ und $E_{\text{Nicht-Binder}}/O_{\text{Nicht-Binder}}$ in ein *online* Berechnungssystem unter <http://www.physics.csbsju.edu/cgi-bin/stats/chi-square> errechnet. Die kritischen Werte (P) der Verteilung der χ^2 -Werte wurde aus entsprechenden Tabellen entnommen bzw. bei Online-Berechnung ausgegeben.

3.6.4 Kumulative Häufigkeit von Aminosäuren der Peptid-Bibliotheken

Peptide einer Bibliothek wurden entsprechend ihrer relativen Affinität zu SurA sortiert. Das Peptid mit höchster Affinität wurde an Position 1 gesetzt, das mit niedrigster in die letzte Position. Es wurde ein Laufindex m dieser Affinität von 1 – n erstellt, wobei n die Anzahl der verwendeten Peptide war. Der Beitrag jeder Aminosäure einer Bibliothek zur Bindungsaffinität wurde durch Berechnung der kumulativen Häufigkeit ($f_X(m)$) jeder Aminosäure nach folgender Formel ermittelt (Kluck *et al.*, 2002):

$$f_X(m) = \frac{\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m N_X(i)}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n N_X(i)}$$

$N_X(i)$ entspricht der Gesamtanzahl von Aminosäure X im Peptid i , n ist die Anzahl der Peptide

in der entsprechenden Bibliothek (146 Peptide, 118 Peptide and 112 Peptide in der LamB-, OmpF- und OmpA-Bibliothek, 376 Peptide gesamt), m (entspricht dem Laufindex) ist eine Zahl zwischen 1 und n .

Beispielsweise ist die Anzahl von Alanin in Peptid 1 ($f_A(1)$) die Anzahl von Alanin in Peptid 1 geteilt durch die Anzahl von Alanin in der gesamten Bibliothek. Weiterhin ist $f_A(2)$ die Anzahl von Alanin in Peptid 1 und 2 geteilt durch die durchschnittliche Anzahl von Alanin in der gesamten Bibliothek. Folglich ergibt bei $f_A(146)$ in der LamB-Bibliothek die Summe der Anzahl von Alanin in Peptid 1 bis 146 geteilt durch die durchschnittliche Anzahl von Alanin in der gesamten Bibliothek 1.

Die erhaltenen Werte der kumulativen Häufigkeiten wurden mittels linearer Regression zur Ermittlung eines virtuellen Binders mit bester Affinität zu SurA eingesetzt. Es wurde gemäß Kluck *et al.* (2002), bei denen Werte zwischen 17,95 und 71,81 % für die Regressionsanalyse verwendet wurden, vorgegangen. Dazu wurden die Werte der LamB-Peptide 26 – 104, der OmpF-Peptide 21 – 85 und der OmpA-Peptide 20 – 80 eingesetzt, um eine Trendlinie, die Zusammensetzung der Peptide repräsentierend, zu erhalten. Der Schnittpunkt mit der Ordinate entspricht der relativen Häufigkeit einer jeden Aminosäure in einem virtuellen, theoretisch besten Binder unter Berücksichtigung der Charakteristika der jeweiligen Bibliothek.

3.6.5 Bioinformatische Analysen von Mustern aromatischer Aminosäuren

Die Häufigkeiten, mit denen aromatische Aminosäuren in einem Peptid gemeinsam mit anderen aromatischen Aminosäuren auftreten, wurden ausgezählt. Dazu wurde beispielsweise die Anzahl an Peptiden mit Phe, Trp sowie Trp *und* Phe ermittelt. Die Anzahl von Trp in Peptiden die auch mindestens ein Phe enthalten wurde durch die Anzahl aller Trp-haltigen Peptide geteilt. Daraus resultierte der relative Anteil Trp-haltiger Peptide, die ein Phe enthielten. Es wurde beispielsweise zunächst der prozentuale Anteil (x %) von Peptiden mit Aminosäure 1 und der prozentuale Anteil (y %) von Peptiden ohne Aminosäure 1 ermittelt. Anschließend wurde berechnet, wie hoch der zu erwartende Anteil von Peptiden mit Aminosäure 2 in Peptiden mit bzw. ohne Aminosäure 1 ist. Aus den erwarteten und den beobachteten Werten der Verteilung von Aminosäure 1 und 2 wurden die χ^2 -Werte (3.6.3) errechnet, um zu ermitteln, ob Aminosäure 2 zufällig auf Peptide mit bzw. ohne Aminosäure 1 verteilt ist, oder ob das Auftreten von Aminosäure 2 an Aminosäure 1 gekoppelt ist.

Zur statistischen Untersuchung der Häufigkeit von Ar-x-Ar und Ar-Ar Motiven in periplasmatischen Proteinen und integralen Außenmembran-Proteinen wurden die erwarteten Frequenzen des Vorkommens in einer Sequenz von 100 Aminosäuren Länge nach folgender Formel ermittelt (Bitto und McKay, 2003):

Ar-x-Ar:

$$98 \cdot (\text{freq}(\text{Ar}))^2 \quad (\text{Bitto und McKay, 2003})$$

Ar-Ar:

$$99 \cdot (\text{freq}(\text{Ar}))^2$$

Die Frequenz des Vorkommens von Ar, Ar-x-Ar und Ar-Ar wurde u.a. durch Einsatz eines PERL-Skriptes (siehe Anhang) durchgeführt, wobei die entsprechenden Suchkriterien (Needleman und Wunsch, 1970) auf einen Sequenz-Satz von OMPs und periplasmatischen Proteinen angewandt wurden. Die Sequenzen der OMPs und periplasmatischen Proteine wurden der *E. coli* Cell Envelope Protein Data Collection (ECCE; <http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/ehrmann/tools/ecce/ecce.htm>) entnommen.

Zur Überprüfung, ob in den zwei Proteinklassen (OMPs, periplasmatische Proteine) die tatsächlich beobachteten Anzahl an Ar-Ar und Ar-x-Ar Motiven von der theoretisch zu erwartenden Anzahl abweicht, wurde nach folgender Formel vorgegangen:

$$\chi^2 = \frac{(n) \times (\text{p.hat} - p)^2}{\text{var}}$$

n = Probenzahl; p.hat = geschätzter/beobachteter Mittelwert; p = wahrer Mittelwert (Vergleichswert); var = Varianz. Daraus konnten die Unterschiede zwischen beobachtetem und erwartetem Wert für das Auftreten der Motive berechnet werden und die Signifikanz der Unterschiede aus entsprechenden Tabellen entnommen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Substratspezifität von SurA

4.1.1 Bindung von SurA an Porin Peptid-Bibliotheken

Nach bisherigen Erkenntnissen ist SurA an der Reifung der Porine, eine Klasse der Proteine der äußeren Membran, beteiligt (Lazar und Kolter, 1996; Rouvière und Gross, 1996; Behrens *et al.*, 2001). So wurde die Interaktion von SurA mit *in vitro* synthetisiertem LamB und OmpF sowie mit Peptiden beobachtet (Rouvière und Gross, 1996; Webb *et al.*, 2001). Allerdings ist bisher unklar, welche Kriterien der Substratbindung auf molekularer Ebene zu Grunde liegen, da weder konkrete Bindestellen in SurA noch in den Substraten bekannt sind. In SurA sind jedoch die für die Chaperon-artige Aktivität relevanten Bereiche bekannt. Die aminoterminalen Region von SurA in Fusion mit seinem kurzen C-Terminus (NCt), also ein Protein, dem beiden PPIase-Domänen fehlen, erfüllt die nahezu vollständige *in vivo*-Funktion von SurA (Behrens *et al.*, 2001). Es ist daher nahe liegend, dass auch die für diese Funktion relevante(n) Substratbindestelle(n) in dieser Region von SurA zu finden ist (sind).

Um die Sequenzen in den Porinen zu identifizieren, die durch SurA erkannt werden, wurden Zellulose-gebundene Peptid-Bibliotheken eingesetzt (Frank, 2002; Reimer *et al.*, 2002). Diese aus 13 Aminosäuren bestehenden, synthetisch hergestellten Peptide, die jeweils um 10 Aminosäuren überlappen, decken die gesamte Primärsequenz der Proteine LamB, OmpF und OmpA ab. Die Peptide wurden durch automatische Peptidsynthese erzeugt (Frank, 2002) und sind am C-terminalen Ende über einen (β -Ala)₂ Linker auf Zellulose mit einer Dichte von ca. 90 – 100 nmol/mm² verankert (Kramer *et al.*, 1993).

Die Durchmusterung der Peptid-Bibliotheken wurde mit zwei SurA Varianten, SurA Wildtyp und SurAN+ICt, durchgeführt, da unterschiedliche Bindemuster beider Proteine an die Bibliotheken ggf. Aufschluss über die Lokalisation der Bindestelle(n) in SurA geben. Die Proteine wurden im Expressionsstamm CAG44102, der die jeweiligen Plasmide pASKSurA bzw. pASKSurAN+ICt enthielt, produziert und mittels der C-terminalen Hexahistidinsequenz affinitätschromatographisch gereinigt (3.1.4, 3.1.7, 3.4.3.1, 3.4.1, 3.4.4.1, 3.4.4.3 und 3.4.4.4; Behrens *et al.*, 2001). Falls erforderlich wurde als zusätzlicher Reinigungsschritt eine Gelfiltration angeschlossen (3.4.4.2). Zur Durchmusterung der Peptid-Bibliotheken wurde die immobilisierte Porin-Peptid-Bibliothek mit einer 170 nM SurA-bzw. SurAN+ICt-Lösung in MP-Puffer (pH 7,6) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Zellulose-Membran wurde gebundenes Protein mittels *Western-Blot* auf PVDF-Membranen transferiert und durch SurA-spezifische Antikörper detektiert (3.4.6). Die mit ECF entwickelte Membran wurde mit einem FluorImager eingelesen. Von jeder Porin Peptid-Bibliothek lagen zwei identische Membranen,

die jeweils mit Protein aus einer anderen Reinigungscharge inkubiert wurden, vor. Die *spot*-Intensitäten wurden durch Übereinanderlegen dreier Fluorogramme, zwei davon von einer Membran, das dritte von der anderen Membran stammend, gemittelt. Die Unterschiede zwischen den Fluorogrammen, die von den zwei identischen Membranen stammen, waren marginal und vermutlich auf leichte Schwankungen der Proteinaktivität zurückzuführen. Über das erhaltene Fluorogramm wurde dann ein Raster gelegt, so dass eine Fläche für jeden einzelnen Peptidspot definiert wurde.

Abb. 15 zeigt, dass einige Peptide stark (hoher Schwärzungsgrad) und einige schwach (niedriger Schwärzungsgrad) bzw. nicht von SurA gebunden wurden. Dieser Befund, dass SurA nur eine bestimmte Auswahl von Peptiden erkannt hat, lässt auf eine Präferenz des Chaperons für spezifische Aminosäureseitenketten schließen.

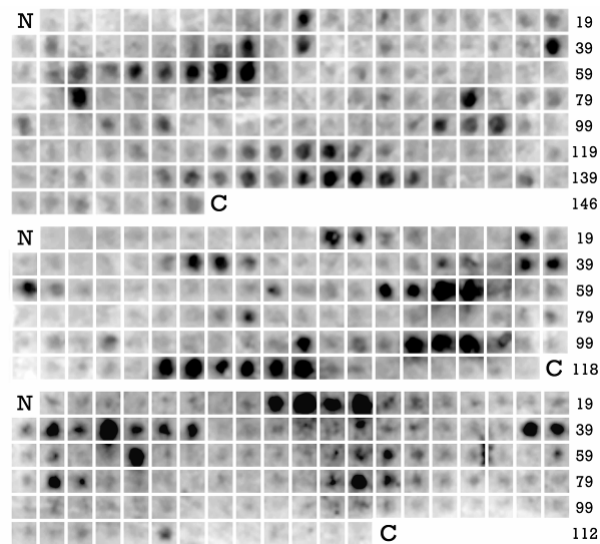


Abb.15: Bindung von SurA an Peptide der LamB (oben), OmpF (mitte)- und OmpA (unten)-Peptid-Bibliothek. Die Peptid-Bibliotheken wurden mit 170 nM SurA bei pH 7,6 für 1h bei Raumtemperatur inkubiert, gebundenes Protein auf eine PVDF-Membran transferriert und immunochemisch detektiert. Die resultierenden Chemifluoreszenz-Signale wurden mit einem *STROM FluorImager* bei blauer Fluoreszenz eingelesen. Dargestellt sind drei übereinandergelegte Fluorogramme aus verschiedenen Experimenten. Die Bibliotheken sind von N- nach C-terminal angeordnet (links nach rechts) und die Zahlen geben die Nummer des letzten Peptides einer Reihe an.

Die Bibliotheken waren so angeordnet, dass eine Überlappung von zwei benachbarten Peptiden von je 10 Aminosäuren vorliegt. Somit sollten Reste, die für die Bindung an SurA entscheidend sind und deren Distanz zwischen nicht mehr als 10 Aminosäuren beträgt, in zwei oder mehreren Peptiden vorkommen. Unter der Annahme, dass die für die Bindung notwendigen Reste in einem Abstand ≤ 10 Aminosäuren angeordnet sind, ist zu erwarten, dass SurA mehrere benachbarte Peptide, die eine gleiche Bindestelle präsentieren, bindet. Wie aus Abb. 15 hervorgeht, trifft dies in den meisten Fällen zu (z.B. LamB-Peptide 43 – 49, OmpF-Peptide 53 – 57 und OmpA-Peptide 9 – 12).

Die Porin Peptid-Bibliotheken wurden neben SurA auch mit SurAN+ICt (170 nM) inkubiert. Das erhaltene Bindemuster von SurAN+ICt entsprach grundsätzlich dem bereits für SurA vorgestellten. Beide SurA-Varianten weisen daher keine erkennbaren Unterschiede bezüglich ihrer Substratspezifität für Porin-spezifische Peptide auf.

Die weitere Analyse der Peptid-Bibliotheken wurde durch Auslesen der Intensitäten einzelner *spots* der gemittelten Fluorogramme (siehe oben) mittels *Scion*-Software durchgeführt (3.4.6).

4.1.2 Klassifizierung der Peptide nach relativen Bindungsaffinitäten

Für die LamB-, OmpF- und OmpA-Bibliotheken wurden je drei Fluorogramme für weitere Untersuchungen verwendet. Es wurden die maximalen *spot*-Intensitäten jedes Fluorogrammes ermittelt und von den erhaltenen Werten ein Fluorogramm-spezifischer Hintergrundwert abgezogen (3.6.1). Letzterer wurde aus Bereichen der Membran ermittelt, an die keine Peptide gekoppelt waren (*spots* 147 – 159 der LamB-, *spots* 119 der OmpF- und *spots* 113 – 119 der OmpA-Bibliothek). Für die OmpF-Bibliothek wurden zusätzlich weitere *spots* als Referenz herangezogen, da keine weiteren peptidfreien Membranflächen als Referenz zur Verfügung standen. Neben *spot* 119 wurden Intensitätswerte der *spots* 1 – 3, 101 und 103 gemittelt und mit dem von 119 verglichen. Da die Werte sehr ähnlich waren, wurde ein Mittelwert aus diesen *spots* als bibliotheksspezifischer Hintergrund herangezogen.

Die Intensitäten wurden anschließend gegen den *spot* höchster Intensität der jeweiligen Porin-Bibliothek normiert (= 100%). Für jedes Peptid wurde so ein normierter relativer Intensitätsmittelwert gebildet und diese Werte als Balkendiagramm dargestellt (Abb. 16). Die Schwankungen der Intensitäten einzelner Peptide zwischen den einzelnen Fluorogrammen lagen bei maximal 10 %. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf Fehlerbalken verzichtet. Die relative Intensität ist hier als ein Maß der relativen Affinität von SurA zu den untersuchten Peptiden zu betrachten.

Die Peptide wurden daher gemäß ihren relativen Intensitäten in drei Klassen eingeteilt, wobei alle *spots* mit einer Intensität ≥ 60 % Klasse I, ≥ 40 % Klasse II und < 40 % Klasse III zugewiesen wurden (in Anlehnung an Rüdiger *et al.*, 2001; Patzelt *et al.*, 2001). Dementsprechend enthielt Klasse I Peptide mit hoher Affinität, Klasse II Peptide mit mittlerer Affinität und Klasse III Peptide mit geringer oder gar keiner Affinität zu SurA. Es wurden 41 Peptide in Klasse I, 37 in Klasse II und 298 in Klasse III gefunden.

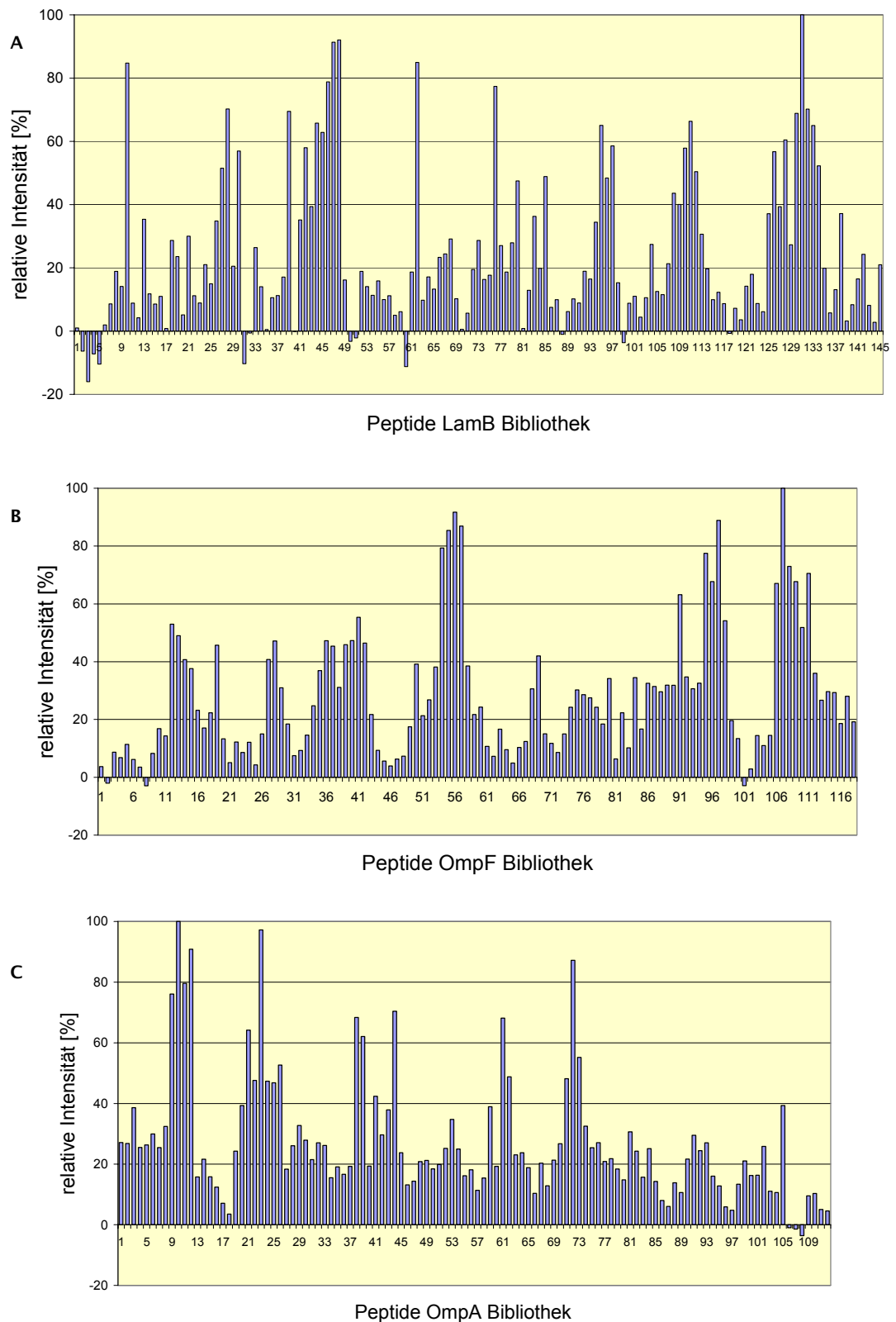


Abb. 16: Relative *spot*-Intensitäten der Peptid-Bibliotheken als Maß der Affinität von SurA zu Peptiden der LamB-(A), OmpF-(B) und OmpA-(C)Bibliotheken. Die dargestellten Werte resultieren aus drei Datensätzen, die aus einem Experiment mit identischen Membranen der jeweiligen Porin Peptid-Bibliotheken stammen. Die Daten wurden gemittelt und gegen den *spot* höchster Intensität (= 100%) normiert.

4.1.3 Analyse der Aminosäurezusammensetzung klassifizierter Peptide

Um die Aminosäuren, die für die Interaktion mit SurA ausschlaggebend sind, identifizieren zu können, wurde die relative Häufigkeit jeder Aminosäure in den drei Klassen ermittelt und gegen ihre Häufigkeit in der Gesamtbibliothek (= 100 %) normiert (3.6.2; Abb. 17A). Eine statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Klasse I+II- und Klasse III-Peptide war für Ile, Leu, Val, Met, Gly, Pro, Asn, Ser, Thr, Lys, Arg und Asp mit $P > 0,05$ nicht gegeben. Hingegen unterschieden sich in Klasse I+II-Peptiden und Klasse III-Peptiden die Häufigkeiten für Ala, Asn, Glu, Phe, Trp, Tyr und His signifikant auf dem 1 % Niveau ($P \leq 0,01$). Cys war ebenfalls in Klasse I+II-Peptiden und Klasse III-Peptiden unterschiedlich verteilt, da hier die Differenz auf dem 5 % Niveau ($P = 0,041$) statistisch signifikant war. Die Beobachtung, dass Pro in Klasse I-Peptiden nicht angereichert sondern eher, wenn auch nicht statistisch signifikant, abgereichert ist, bestätigt die bisherigen Befunde, nach denen ein Modell-Peptid ohne Pro von SurA als Substrat erkannt wurde (Webb *et al.*, 2001). In den Klassen I+II liegt der Anteil Prohaltiger-Peptide bei nur 22 %, was ebenfalls die Unabhängigkeit von Pro bei der Substraterkennung untermauert. Schließlich kann aufgrund der Abreicherung von Ala und einer fehlenden Anreicherung von Ile, Leu, und Val relativ sicher ausgeschlossen werden, dass allein hydrophobe Interaktionen für die Bindung der Peptide verantwortlich sind.

Keines der 16 Cysteine aus der Gesamtbibliothek wurde in Klasse I+II-Peptiden gefunden, was darauf hinweist, dass Cys nicht zur Interaktion mit SurA mit Peptiden beiträgt. Anders bei den aromatischen Aminosäuren, die in den Klasse I+II-Peptiden deutlich häufiger vorkommen als in Klasse III-Peptiden. An dieser Stelle wird darauf hingewiesen, dass His aufgrund seines aromatischen Ringes mit delokalisierten π -Elektronen hier als aromatische Aminosäure betrachtet wurde. Zur Überprüfung, ob bestimmte aromatische Aminosäuren bevorzugt in Kombination mit anderen aromatischen Aminosäuren auftreten, wurde eine statistische Analyse durchgeführt. Unter den Peptiden der Bibliotheken waren Phe, Trp und Tyr zueinander statistisch verteilt und somit nicht gekoppelt. Ebenso waren weder Trp noch Tyr mit His gekoppelt. Allerdings war His in Phe-haltigen Peptiden überdurchschnittlich oft vertreten, was auf eine Kopplung des Auftretens von His mit Phe hindeutet ($P = 0,004$). Trotz dieses Befundes wurde His mit in die weiteren Analysen einbezogen, da trotz der beobachteten Kopplung ein Beitrag von His zur Bindung von Peptide an SurA nicht auszuschließen ist. Zudem enthielt nur ein geringer Anteil an Klasse I+II Peptiden (8,4 %) bzw. an Gesamtbibliotheks-Peptiden (8,5 %) beide Aminosäuren.

Die Gruppierung der Peptide der Klassen I, II und III gemäß ihrem Gehalt an aromatischen Aminosäuren (Abb. 17B) zeigt, dass der Anteil an Klasse I+II-Peptiden mit zunehmender Zahl aromatischer Aminosäuren in den Peptiden steigt. Alle Peptide ohne aromatische Aminosäuren und alle, bis auf eins, der 111 Peptide mit einem aromatischen Rest waren in der Klasse III zu

finden. Der Anteil von Klasse III-Peptiden sinkt jedoch bei ansteigender Zahl an aromatischen Aminosäuren, so dass letztendlich die Gruppe von Peptiden mit 5 und 6 aromatischen Aminosäuren nur noch von Klasse I-Peptiden gestellt wird. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass eine recht große Gruppe von Peptiden mit zwei, drei oder vier aromatischen Aminosäuren sowohl Vertreter der Klasse III als auch der Klassen I+II enthält. Hier liegen also bei gleicher Anzahl an aromatischen Aminosäuren Peptide aus Klassen vor, die unterschiedliche Affinitäten zu SurA repräsentieren. Daraus kann neben den aromatischen Aminosäuren auf eine zusätzliche bindungsrelevante Determinante geschlossen werden, die zur Unterscheidung von Klasse I+II-Peptiden und Klasse III-Peptiden beiträgt.

Die relative Häufigkeit aromatischer Aminosäuren pro Peptid steigt von 1,7 bei Klasse III-Peptiden auf 2,9 bzw. 3,3 bei Klasse II bzw. Klasse I-Peptiden (Abb. 17C), was die Präferenz von SurA für diese Aminosäurereste unterstreicht.

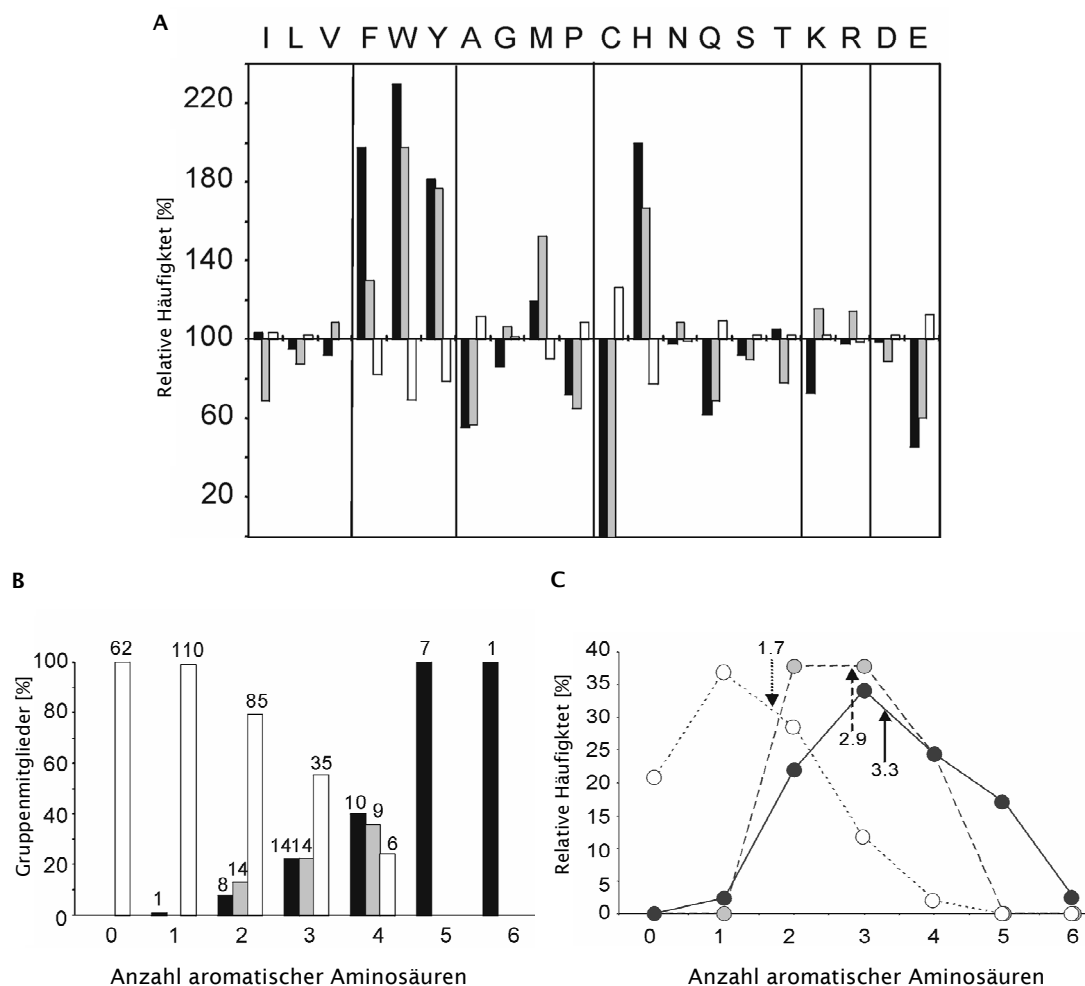


Abb. 17: Analyse der Aminosäurezusammensetzung von Peptiden der Peptid-Bibliotheken von LamB, OmpF und OmpA. (A) Relative Aminosäure-Häufigkeiten in Peptiden der drei Peptidaffinitäts-Klassen: Klasse I (schwarze Balken), Klasse II (graue Balken) Klasse III (weiße Balken). Die Werte wurden gegen die Gesamthäufigkeiten der Bibliothek normiert (= 100 %). (B) Relative Häufigkeit der Peptide der Klassen I, II und III in Abhängigkeit der Anzahl aromatischer Aminosäuren in den Peptiden (Farbgebung wie oben). Die Anzahl der Peptide ist über den Balken angegeben.

(C) Verteilung der Peptide der Klassen I, II und III über die Anzahl aromatischer Aminosäuren in den Peptiden. Klasse I-Peptide als schwarze Kreise, Klasse II-Peptide als graue Kreise und Klasse III-Peptide als weiße Kreise dargestellt.

Die beobachtete Abreicherung von Glu (Abb. 17A) könnte darauf hindeuten, dass Ladung eine Rolle bei der Bindung spielen kann. Um dieses zu untersuchen, wurde die Nettoladung der Peptide der Klassen I+II bzw. Klasse III mit der Anzahl der aromatischen Aminosäuren verglichen (Abb. 18). Aufgrund der geringen Datenmenge streuen die Werte für Klasse I+II-Peptide jedoch stark und der resultierende R^2 -Wert für die Regressionsgerade ist mit 0,71 deutlich schlechter, als der R^2 -Wert (0,98) für die Regressionsgerade der Klasse III-Peptide. Obwohl die auf Basis dieser Daten beobachteten Nettoladungsdifferenzen zwischen beiden Peptidklassen (I+II gegenüber III) daher möglicherweise nicht statistisch signifikant ist, ist es dennoch auffällig, dass die durchschnittliche Nettoladung SurA-bindender Peptide (Klasse I+II) in allen Peptidgruppen mit identischer Anzahl aromatischer Aminosäuren höher ist, als die der Nichtbindenden Peptide (Klasse III).

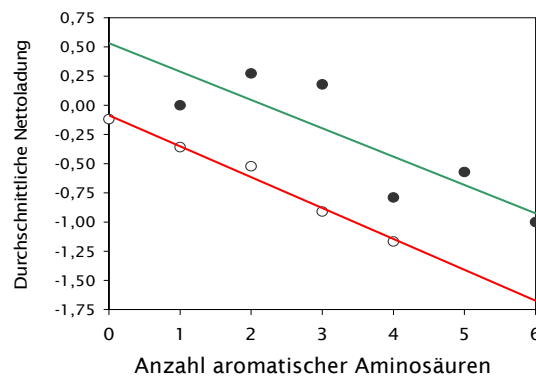


Abb. 18: Durchschnittliche Nettoladung der Klasse I+II-Peptide sowie der Klasse III-Peptide in Abhängigkeit der Anzahl aromatischer Aminosäuren in den Peptiden. Die Regressionsgerade der Klasse III-Peptide ist als rote Linie, die der Klasse I- und II-Peptide als grüne Linie dargestellt.

4.1.4 Ermittlung eines theoretisch besten Binders für SurA in den Porin Peptid-Bibliotheken

Ein weiterer Ansatz zur Auswertung der Peptid-Bibliotheken war die Berechnung der Aminosäurezusammensetzung nach Kluck *et al.* (2002), bei der ein „virtuell“ bester Binder, der in seiner Zusammensetzung die Charakteristika der Bibliothek berücksichtigt, ermittelt wird (Kluck *et al.*, 2002). Dadurch wird der Beitrag jeder einzelnen Aminosäure zur Bindungsaffinität ersichtlich. Die Peptide wurden nach abnehmender relativer Affinität zu SurA geordnet und die kumulative Häufigkeit jeder Aminosäure aus der Summe der Häufigkeit einer Aminosäure in einem Peptid, geteilt durch die Summe relativer Häufigkeit einer Aminosäure in einer Bibliothek berechnet (3.6.4.). Die daraus erhaltene kumulative Häufigkeit jeder Aminosäure wurden gegen

die nach Affinität geordneten Peptide der drei Bibliotheken aufgetragen (Abb. 19, nur das Diagramm der LamB-Bibliothek gezeigt). Bereits in dieser Darstellung ist ein erhöhter Anteil aromatischer Aminosäuren in Peptiden hoher Affinität zu SurA zu erkennen.

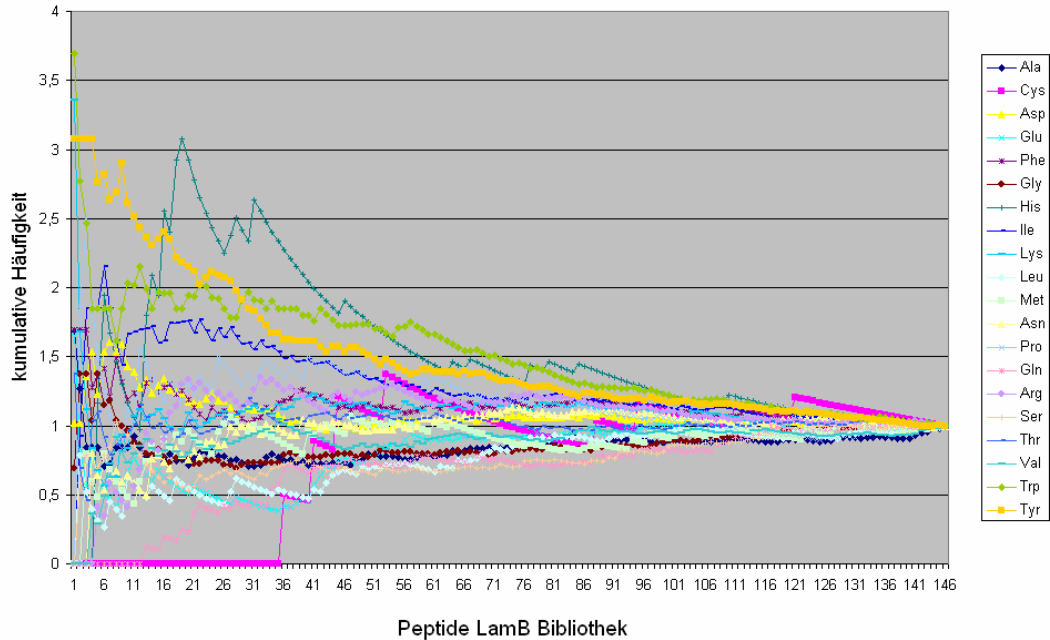


Abb. 19: Kumulative Häufigkeiten von Aminosäuren der LamB- Bibliothek. Die Peptide wurden nach Affinität zu SurA sortiert, Position 1 enthält den Binder mit höchster, Position 146 den Binder mit geringster Affinität. Die kumulative Häufigkeit aromatischer Aminosäuren ist in Bindern deutlich erhöht.

Die kumulativen Häufigkeiten wurden dann mittels linearer Regression zur Ermittlung eines virtuellen Binders mit bester Affinität zu SurA herangezogen. Es wurde gemäß Kluck *et al.* (2002) vorgegangen, indem die kumulativen Häufigkeiten der Peptide 26 – 104 der LamB-, 21 – 85 der OmpF- und 20 – 80 der OmpA-Bibliothek zu einer Regressionsanalyse herangezogen wurden. Der Schnittpunkt der resultierenden Trendlinie mit der Ordinate gibt die relative Häufigkeit jeder Aminosäure in einem virtuellen, theoretisch besten Binder unter Berücksichtigung der Charakteristika der jeweiligen Bibliothek wieder (Abb. 20). Es wird deutlich, dass die relative Häufigkeit der aromatischen Aminosäuren in dem theoretisch besten Binder aller drei Peptid-Bibliotheken deutlich erhöht ist (mit Ausnahme von Trp in der OmpF-Bibliothek). Die relativen Häufigkeiten der Aminosäuren eines besten Binders der Gesamtbibliothek (Abb. 20D) entsprechen qualitativ den bereits in Abb. 17A dargestellten Tendenzen, die durch Klassifizierung der Peptide auf Basis ihrer relativen Bindungsaffinitäten zu SurA erstellt wurde. Damit wurde ein Beitrag aromatischer Aminosäuren zur Bindung der Peptide durch SurA mit zwei alternativen Analyseverfahren bestätigt.

Aus Abb. 20 ist ferner die Individualität jeder Porin-Peptid-Bibliothek ersichtlich. So sind Phe in der LamB- und His in der OmpA-Bibliothek nur schwach angereichert und Trp ist in der

OmpF-Bibliothek sogar leicht abgereichert. Die bereits in Abschnitt 4.1.3 beschriebene Abreicherung von Glu findet sich in allen drei theoretisch besten Bindern wieder, während Pro in den theoretischen OmpF- und OmpA-Peptiden deutlich abgereichert, in dem LamB-Peptid aber angereichert ist.

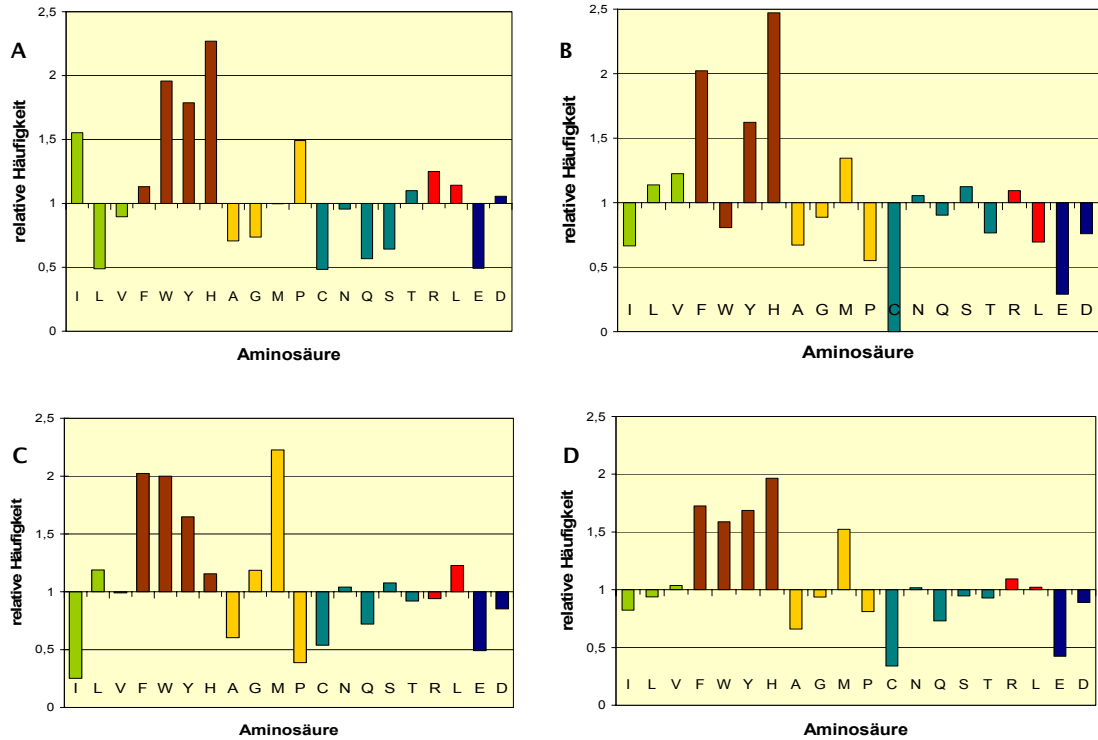


Abb. 20: Relative Häufigkeiten von Aminosäuren eines theoretischen Peptides mit höchster Affinität zu SurA unter Berücksichtigung der individuellen Komposition der jeweiligen Bibliothek: LamB (A), OmpF (B), OmpA (C) und der Durchschnitt aus A bis C (D).

Bei der Auswertung der Peptidklassen (4.1.3) ist Pro in den Klassen I und II leicht, wenn auch nicht signifikant abgereichert, was im Einklang mit der relativen Häufigkeit von Pro im theoretisch besten Binder der Gesamtbibliothek (Abb. 20D) steht. Met ist in allen drei Peptiden, die nach Kluck *et al.* (2002) ermittelt wurden, mit Werten von 1,5, 1,3, und 2,2 angereichert. Die gleiche Tendenz ist bei Klasse I- und II-Peptiden erkennbar (Abb. 17A, 4.1.3). Auch die Abreicherung von Cys in den theoretisch besten Bindern von SurA ist in Klasse I- und II-Peptiden wiederzufinden.

4.1.5 Analysen zur Positionierung aromatischer Aminosäuren in SurA-bindenden Peptide

Die bisherigen Daten (4.1.3 und 4.1.4) zeigen eine Anreicherung von aromatischen Aminosäuren in von SurA gebundenen Peptiden. Bei genauerer Betrachtung dieser Peptide zeigte sich, dass die aromatischen Aminosäuren häufig in bestimmten Mustern der Form Ar-x-Ar und Ar-Ar, wobei „Ar“ den aromatischen Aminosäuren (F,Y,W oder H) und „x“ jeder

Weiterhin interessant ist die Anordnung der aromatischen Seitenketten im Ar-x-Ar-x_n-Ar Motiv. Mit einer flankierenden aromatischen Aminosäure, fast ausnahmslos in der Position (n) 3, 5 oder 7 bezüglich des Ar-x-Ar Motives, liegt eine ungeradzahlige Positionierung vor, die auf eine bevorzugte Orientierung der Seitenketten hinweist.

Im Vergleich zum Ar-x-Ar Motiv, kommt das Ar-Ar Motiv mit etwa der gleichen Häufigkeit in Klasse I-Peptiden vor, ist jedoch in Klasse II-Peptiden weniger zu finden (Tabelle 7). Dieser Befund könnte darauf hindeuten, dass das Ar-Ar Motiv von SurA weniger bevorzugt wird. Es ist jedoch auch möglich, dass das Ar-Ar Motiv präferentiell eher von SurA gebunden wird und daher vorwiegend in Klasse I-Peptiden zu finden ist.

Tabelle 7: Häufigkeiten von Ar-x-Ar- und Ar-Ar-Motiven in Peptiden der Bibliotheken

	Anzahl Ar-x-Ar	Ar-x-Ar pro Peptid	Anzahl Ar-Ar	Ar-Ar pro Peptid
Gesamtbibliotheken	78	0,21	71	0,19
Klasse I-Peptide	29	0,71	35	0,85
Klasse II-Peptide	21	0,57	13	0,22
Klasse III-Peptide	28	0,09	23	0,08

Aus Tabelle 7 wird weiterhin ersichtlich, dass auch einige Peptide in Klasse III ein Ar-x-Ar oder Ar-Ar Motiv tragen. Diese 51 Peptide weisen eine der nachfolgenden Eigenschaften auf, durch die die schwache oder nichtvorhandene Affinität zu SurA erklärt werden könnte. Zunächst sind fünf dieser Peptide durch die Klassifizierung gerade unter die gesetzte Grenze von 40 % gefallen. Diese Peptide hatten *spot*-Intensitäten zwischen 35 und 39 % und könnten daher durchaus mit SurA interagieren.

Aufgrund der C-terminalen Verankerung der Peptide ist es denkbar, dass Motive am C-Terminus eines Peptides für SurA nicht oder nur begrenzt zugänglich waren. Die Peptide sind über einen (β-Ala)₂ Linker auf Zellulose verankert, sodass die Nähe zur Zellulosemembran möglicherweise ein sterisches Hindernis darstellt. Dies könnte für 12 Peptide mit einem C-terminalen Ar-x-Ar oder Ar-Ar Motiv, darunter auch die C-terminalen Motive von LamB und OmpF, zutreffen. Für ein dem C-terminalen OmpF-Peptid ähnlichen Peptid (**DNRDGNVYQF**, hervorgehobene Aminosäuren sind mit dem C-terminalen Peptid von OmpF identisch), wurde allerdings auch in Lösung nur eine schwache Interaktion mit SurA nachgewiesen (Bitto und McKay, 2003). In vier Fällen wurde jedoch eine Bindung von SurA an die in den Bibliotheken benachbarten Peptiden beobachtet, so dass in diesen Fällen eine mögliche Erklärung für die geringe Affinität gegeben ist.

Des Weiteren sind 16 Klasse III-Peptide mit einem Ar-x-Ar oder Ar-Ar Motiv vorhanden, die jedoch keine zusätzliche, flankierende aromatische Aminosäure aufweisen. Ebenso gibt es aber auch 6 Peptide unter Klasse I- und II-Peptiden, fünf davon mit einem Ar-x-Ar Motiv, bei denen

dieses auch der Fall ist. Daraus lässt sich auf eine weitere für die Bindung durch SurA relevante Eigenschaft schließen, die die Klasse I- und II-Peptide, im Vergleich zu den Klasse III-Peptiden neben dem aromatischen Motiv offensichtlich aufweisen. Es wurden weiterhin 15 Peptide gefunden, die trotz eines vollständigen Musters an aromatischen Aminosäuren, nicht unter Klasse I- und II-Peptiden gefunden wurden. Diese Peptide weisen einen erhöhten Anteil von negativ geladenen Aminosäuren im Verhältnis zu aromatischen Aminosäuren auf ($\geq 0,67$), was ebenfalls auf eine, die Bindung negativ beeinflussende Rolle negativer Ladung schließen lässt (vgl. Abb. 18, 4.1.3).

Es wurde von Bitto und McKay ein im Vergleich zu peri- und cytoplasmatischen Proteinen erhöhtes Auftreten des Ar-x-Ar Motivs in OMPs beobachtet und dieses Motiv als Charakteristikum der OMPs eingestuft (Bitto und McKay, 2003). Um zu überprüfen, ob auch das Ar-Ar Motiv eine erhöhte Häufigkeit in OMPs aufweist, wurde ermittelt, wie oft das Ar-Ar- oder Ar-x Ar Motiv in OMPs und in periplasmatischen Proteinen auftreten (3.6.5; Tabelle 8).

Tabelle 8: Häufigkeiten aromatischer Motive in Proteinen der Zelloberfläche von *E.coli*

Die Proteine (35 OMPs und 118 periplasmatische Proteine) wurden von Annotationen der *E. coli* Cell Envelope Protein Data Collection (ECCE; <http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/ehrmann/tools/ecce/ecce.html>) entnommen.

Proteine	Häufigkeit von Ar [%]	Ar-x-Ar pro 100 Aminosäuren				Ar-Ar pro 100 Aminosäuren			
		Beobachtet	Erwartet	Varianz	P-Wert	Beobachtet	Erwartet	Varianz	P-Wert
Integrale OM	12,12	1,70	1,44	0,908	0,105	1,11	1,45	0,365	0,0006
Periplasmatische	7,89	0,545	0,61	0,252	0,13	0,72	0,62	0,301	0,048
MalE	10,1	1,77	1,00	-	-	1,01	1,01	-	-

Tatsächlich wurde, wie bereits in der Literatur beschrieben, eine leichte Erhöhung der Häufigkeit des Ar-x-Ar Motivs bei OMPs im Vergleich zu periplasmatischen Proteinen gefunden, (Bitto und McKay, 2003). Das Ar-Ar Motiv tritt in OMPs mit unerwartet niedriger Frequenz auf, und ist im Vergleich zu periplasmatischen Proteinen weniger deutlich angereichert. Somit ist das Ar-Ar Motiv nicht charakteristisch für OMPs. Das periplasmatische Protein MalE, für das bereits gezeigt wurde, dass es kein Substrat für SurA ist (Behrens *et al.*, 2001), weist genauso viele Ar-x-Ar Motive auf 100 Aminosäuren wie OMPs auf (1,77 für MalE zu 1,70 für OMPs). Die erwartete Frequenz (1,00) ist zudem unter dem beobachteten Wert (1,77), somit kommt das Ar-x-Ar Motiv in MalE mit einer höheren als der zufälligen Frequenz vor. Dies deutet neben aromatischen Motiven auf eine zweite, bindungsentscheidende Determinante hin.

4.1.6 Strukturanalyse der Peptide der Porin-Bibliotheken

Die Struktur eines Peptides, also die räumliche Anordnung der Aminosäureseitenketten und der Verlauf des Peptid-Rückrates, ist ein weiterer ein wichtiger Aspekt, der bei spezifischer Bindung

eines Proteins oder Peptides an ein Protein eine Rolle spielen kann. Daher wurde untersucht, ob Klasse I- und II-Peptide gemeinsame Strukturmerkmale aufweisen, die möglicherweise neben den bevorzugten Mustern aromatischer Aminosäuren zur Bindung des Peptides an SurA beitragen. Eine Gemeinsamkeit aller integralen OMPs ist die β -*barrel*-Struktur ihrer Transmembranregion. In einem β -Strang wären mindestens zwei aromatische Aminosäuren auf einer Seite des Stranges, eine dritte aromatische Aminosäure auf der derselben oder gegenüberliegenden Seite ausgerichtet. Die Vorhersage der Sekundärstruktur (Jones, 1999; McGuffin *et al.*, 2000) aller Peptide der Porin-Bibliotheken (Tabelle 9) ergab folgende Ergebnisse:

Tabelle 9: Vorhergesagte Sekundärstruktur von Peptiden der Porin-Bibliotheken

	β -Strang [%]	α -Helix [%]	<i>random coil</i> [%]
Gesamtbibliotheken	36,7	14,4	48,9
Klasse I	56,1	4,9	39,0
Klasse II	56,7	13,5	29,7
Klasse III	31,5	15,8	52,7

Es wurde für die überwiegende Anzahl von Peptiden (48,9 %) der Gesamtbibliothek eine *random coil* Struktur vorhergesagt, gefolgt von 36,7 % mit β -Strang und nur 14,4 % mit α -helikaler Struktur. Eine Gegenüberstellung dieser vorhergesagten mit der nativen Sekundärstruktur der jeweiligen Proteine (siehe Anhang), ergab eine sehr große Übereinstimmung, was die hohe Genauigkeit dieser Vorhersage bestätigt und eine zuverlässige Basis für Analysen darstellt. Unter den vorhergesagten *random coil* Strukturen waren einige, die im nativen Protein eine β -Strang Konformation eingenommen haben, wodurch möglicherweise der tatsächliche Anteil an β -Strängen nochmals erhöht ist. Der Anteil von β -Strängen in Klasse I- und II-Peptiden liegt mit 56,1 und 56,7 % deutlich über dem Anteil in Klasse III-Peptiden, der sich mit 31,5 % sogar etwas unter dem Durchschnitt der Gesamtbibliothek befindet. Die α -helikalen Strukturen sind in Klasse I-Peptiden deutlich abgereichert (4,9 %), wohingegen Klasse II (13,5 %)- und Klasse III (15,8 %)-Peptide einen Anteil an α -helikalen Strukturen aufweisen, der sehr nahe bei dem Wert der Gesamtbibliothek (14,4 %) liegt. Die vorhergesagten α -Helices, die dennoch unter den Klasse I+II-Peptiden gefunden wurden, zeigten allerdings in der *Helical-Wheel* Vorhersage eine Ausrichtung von mindestens zwei aromatischen Seitenketten auf der gleichen oder gegenüberliegenden Seite der Helix (Daten nicht gezeigt).

Diese Resultate implizieren ein Zusammenwirken von *Mustern* aromatischer Aminosäuren und der *Orientierung* ihrer aromatischen Seitenketten. Aus den vorhergesagten Sekundärstrukturen kann auf eine Präferenz von SurA für Peptide, welche eine Ausrichtung von mindestens zwei aromatischen Seitenketten mit einem Abstand von maximal 7 Aminosäuren einer Seite

aufweisen, geschlossen werden. Zusätzlich liegt häufig eine dritte aromatische Aminosäure entweder auf derselben oder der gegenüberliegenden Seite des Peptides vor. Der Anteil solcher Peptide mit einem Abstand von 7 Aminosäuren zwischen dem Motiv und dem zusätzlichen Aromat liegt bei 92 % unter den Klasse I-Peptiden. In OMPs liegen die meisten aromatischen Muster in β -Strängen oder β -*loops*. Gegeben durch diese strukturellen Eigenschaften, würde dieser Befund plausibel erklären, wie SurA selektiv zwischen integralen Außenmembran- und periplasmatischen Proteinen unterscheiden kann. Im Fall von MalE, welches ebenfalls fünf Ar-x-Ar Motive besitzt, liegen diese Motive in der nativen Struktur in einer α -Helix, wodurch die Determinante der Orientierung der aromatischen Seitenkette möglicherweise nicht erfüllt wäre.

4.1.7 Lokalisierung aromatischer Muster in den nativen Strukturen von LamB, OmpF und OmpA

Die in den Peptiden identifizierten aromatischen Muster und aromatischen Aminosäuren wurden in den bekannten Strukturen von LamB, OmpF und OmpA lokalisiert, um ihre Positionen im nativen Protein festzustellen. Die drei Proteine zeichnen sich durch eine β -*barrel*-Struktur aus, die von zwei *aromatic belts*, je 10 Å von der Mitte der Außenmembran entfernt, umlaufen wird (Seshadri *et al.*, 1998). Zusätzlich besitzt LamB die so genannte *greasy slide*, eine kontinuierliche Abfolge von aromatischen Aminosäuren im Innern der Pore, die den Transport von Maltose ermöglicht (Van Gelder *et al.*, 2002). An bestimmten Positionen ist daher ein verstärktes Auftreten aromatischer Aminosäuren zu erwarten. Aus Abb. 22 ist zu ersehen, dass die aromatischen Muster in den OMP-Strukturen in transmembranen β -Strängen, internen *turns* und externen *loops* ohne klare Regelmäßigkeit lokalisiert sind.

In LamB war die Hälfte der aromatischen Muster in den externen *loops* L3, L4, L6 und L9, zu finden, die andere Hälfte in den β -Strängen S1, S3, S10, S11, S14 und S17. Weiterhin ist *loop* 3 in LamB, der in die Pore zurückfaltet, durch zwei überlappende Muster abgedeckt. Die Peptide der LamB-Bibliothek, die dieses Muster präsentieren, gehören zu den Peptiden höchster Affinität zu SurA (Klasse I). Die in den β -*loops* L3, L6 und L9 liegenden aromatischen Muster befinden sich in β -Strängen. In OmpF hingegen ist eine Hälfte der aromatischen Muster in den transmembranen Strängen, die andere in internen *turns* vertreten. Die Muster, die beide *aromatic belts* durchziehen und daraus aromatische Aminosäuren rekrutieren, sind in Strang S1, S3, S10 und S14 von LamB und S1, S3, S5 und S14 von OmpF sowie in Strang S1 und S3 von OmpA lokalisiert. Daraus lässt sich ableiten, dass diese Stränge von SurA möglicherweise komplett gebunden werden. Dies wäre unter dem Aspekt der Beteiligung von Strang S1 und S3 in LamB und OmpF an der Kontaktstelle der Trimeruntereinheiten interessant. Im Gegensatz dazu fehlen in den membranexponierten Bereichen die SurA Bindestellen fast gänzlich. In LamB umfasst dieser Bereich die Stränge S4 bis S9, in die Stränge OmpF S7 bis S11 und in OmpA den C-terminalen Bereich des β -*barrels* und die periplasmatische Domäne. In OmpA liegt ein Ar-x-

Die fünf Ar-Ar bzw. Ar-x-Ar Motive, die nicht in bindenden Peptiden gefunden wurden, sind in folgenden Positionen der Porine zu finden:

zwei Motive am C-Terminus von LamB, ein Motiv am C-Terminus von OmpF, ein Ar-Ar Motiv am Ende von *loop 3* in OmpF und ein Ar-x-Ar Motiv am Ende von Strang 7 in OmpA. Die Motive bzw. die flankierende aromatische Aminosäure dieser Motive war in vier Fällen nah am C-Terminus des entsprechenden Peptides positioniert und die Bindung somit vermutlich durch die räumliche Hinderung nicht hinreichend. Für das Ar-Ar Motiv am Ende von Strang 3 in OmpF traf dies nicht zu. In den entsprechenden Peptiden wurde das aromatische Motiv jedoch von negativ geladenen Aminosäuren umgeben und das Verhältnis negativ geladener zu aromatischen Aminosäuren war $\geq 0,67$. Wie bereits unter 4.1.5 ausgeführt, könnte die negative Ladung die Bindung des Peptides negativ beeinflussen.

4.1.8 Interaktionsanalyse zwischen SurAN+ICt und Peptiden mittels SPR-Spektroskopie

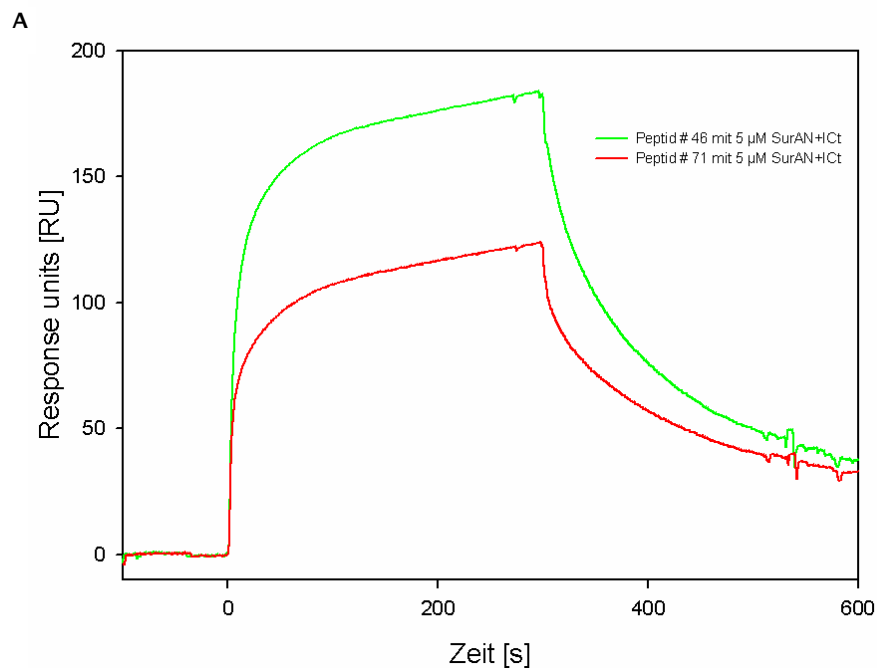
Aus den bisherigen Untersuchungen zu der Interaktion von Peptiden der Porin-Bibliotheken mit SurA konnte nur qualitativ auf eine Bindung geschlossen werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse der Durchmusterung der Porin-Bibliotheken sollte zusätzlich die Interaktion von SurA mit Peptiden durch eine alternative Methode analysiert werden. Zudem waren keine Informationen über die Kinetik der Bindung vorhanden, durch die Klassifizierung der Peptide konnten lediglich relative Affinitäten zu SurA beschrieben werden. Um nun aber quantitative Informationen, z.B. die Gleichgewichtskonstante K_D , über die beobachteten Interaktionen zu erhalten, wurde die *surface plasmon resonance* Spektroskopie herangezogen (3.5.3). Bei dieser Methode wurden ausgewählte synthetische Peptide der LamB-Bibliothek auf einem C1-Chip immobilisiert und SurA-Lösung über diesen Chip gegeben. Die Interaktion des Proteins mit dem Peptid wurde dabei als Zunahme der Masse spektroskopisch verfolgt.

Es wurden zwei Peptide der LamB Bibliothek zur Analyse gewählt, eines aus Klasse I (DVHMIDFYWDIS, 46) und eines aus Klasse III (TLELGVDYGRANL, 71), um direkte Vergleiche innerhalb einer Bibliothek zu erhalten. Das Klasse I-Peptid stammt aus einer ganzen Abfolge von überlappenden Mustern (Peptide 44 – 49, siehe oben), in der nativen Struktur von LamB in *loop 3* lokalisiert, während die Sequenz des Klasse III-Peptides in Strang 8 zu finden ist. Das Augenmerk lag auf der Frage nach der tatsächlichen Affinität eines Klasse I-Peptides im Vergleich zu einem Klasse-III Peptid. Die synthetischen, mit einem zusätzlichen C-terminalen Cystein versehenen Peptide, wurden *via* Thiol-Kopplung auf einem *BiaCore* C1-Chip immobilisiert (3.5.3.1). Um kinetische Messungen durchführen zu können, wurde von beiden Peptiden ca. 20 bis 30 RU, entsprechend 10 bis 15 fmol, zur Kopplung eingesetzt. Dabei wurde mehr vom Klasse III-Peptid verankert, damit ein direkter Vergleich der beiden Peptide möglich

ist, der im umgekehrten Fall vermutlich das Ergebnis verzerrt hätte. Die Menge an gekoppeltem Peptid 46 (Flußzelle 2) lag mit 10,3 fmol ein Drittel unter der von 71 (Flußzelle 1) mit 15,8 fmol. Aus technischen Gründen wurde mit der Variante SurAN+ICt gearbeitet, welches bei der Durchmusterung identische Peptide wie SurA erkannte.

Das rekombinant produzierte und gereinigte Protein wurde zunächst bei unterschiedlichen Flußraten von 5 – 75 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert und das erhaltene Spektrum ausgewertet (3.4.3.1, 3.4.4.1, 3.4.4.2 und 3.5.3.2). Diese Kontrollexperimente zeigten, dass SurAN+ICt nicht unspezifisch an die Peptide gebunden hat und dass mögliche Bindungen von SurAN+ICt an die Chip-Oberfläche nicht die Messungen beeinflussten. Weiterhin wurde untersucht, ob eine Sättigung der Bindung eintritt. Dazu wurde der Verlauf der Kurven über die Zeit registriert, wobei sich eine leichte Zunahme der Masse abzeichnete. Dieses wurde bei unterschiedlichen Flußraten und Injektionsmengen festgestellt. Dieser Effekt wäre beispielsweise durch eine Multimerisierung von SurAN+ICt zu erklären.

Messungen zur Bestimmung der Gleichgewichts-Konstante wurden generell bei einer Flußrate von 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 25 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Es zeigte sich eine verstärkte Affinität von SurAN+ICt zu Peptid 46, im Vergleich zu Peptid 71. Mittels *online subtraction* wurden von den Werten für Peptid 46 die Werte für Peptid 71 direkt abgezogen (Abb. 23A). Zur eigentlichen Bestimmung der K_D wurde mit Konzentrationsreihen von 100 nM bis 5 μM SurAN+ICt gearbeitet, als Kontrolle diente Laufpuffer (Abb. 23B). Die Spektren wurden mit *Biaevaluation* Software 3.2 mit einem 1:1 Bindungsmodell ausgewertet, der *Fit* der Kurven wich dabei leicht von den standardmäßig vorgegebenen Kurve ab ($\chi^2 = 4$). Die Experimente wurden in je drei Zyklen mit zufälliger Reihenfolge der Injektionsproben und verschiedenen Proteinchargen durchgeführt.



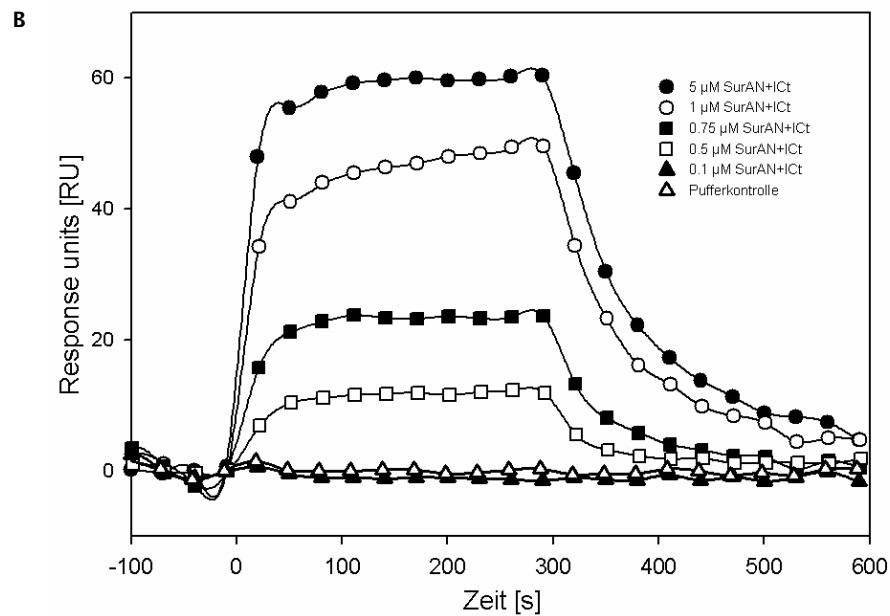


Abb. 23: Interaktionsanalyse von SurAN+ICt mit einem Klasse I (46)- und Klasse III (71)-Peptid aus der LamB-Bibliothek. (A) Die Affinität zu 46 ist höher als zu 71, obwohl 71 eine gewisse Affinität zu SurAN+ICt aufweist. (B) Durch Subtraktion der Werte für 71 von den Werten für 46 erhält man die Nettobindung von SurAN+ICt an 46, hier in einer Konzentrationsreihe von 0,1 bis 5 μM , mit Pufferkontrolle. Die daraus errechnete Gleichgewichts-Konstante lag bei 2 μM . Die Experimente wurden mit verschiedenen Proteinchargen jeweils in drei Zyklen durchgeführt.

Die erhaltenen K_D Werte lagen bei 1,6 bis 2,7 μM , im Durchschnitt bei 2 μM . Dieser Wert ist im unteren Bereich der K_D von 1 bis 14 μM angesiedelt, die über isothermale Titrations Kalorimetrie (ITC) für ein Peptid-Heptamer (WEYIPNV) bestimmt wurde (Bitto und McKay, 2003).

4.1.9 Studien zur Spezifität und Affinität der Interaktion zwischen Peptiden und SurA mit Fluoreszenzspektroskopie

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Bindung von Peptiden durch SurA war die Fluoreszenzspektroskopie (McCarty *et al.*, 1996; Patzelt *et al.*, 2001). Dabei wurde ein fluoreszenzmarkiertes Peptid mit und ohne SurA spektroskopisch analysiert und durch Konkurrenz mit unmarkierten Peptiden die Spezifität der Peptid-SurA-Interaktion untersucht (3.5.4.3). Hierzu wurde das mit 2-(4-Iodoacetamido) Anilino-Naphtalen-6-Sulfonsäure (IAANS) markierte Peptid 46* (DVHMIDFYWDISC*) eingesetzt. Ferner wurden für Konkurrenzstudien die unmarkierten Peptide 46 (Ac-DVHMIDFYWDIS- $L_{(\text{Ac})}$ -NH₂, Ac = acetyliert;), 71 (Ac-TLELGVDYGRANL- $L_{(\text{Ac})}$ -NH₂) und 62 (Ac-NIYDYTNETANDV- $L_{(\text{Biotin})}$ -NH₂) aus der LamB-Bibliothek verwendet. Peptid 62 ist in der Peptid-Bibliothek als Einzelbinder von SurA (die benachbarten Peptide wurden nicht durch SurA gebunden) charakterisiert worden (siehe oben) und trägt ein Ar-x-Ar Motiv.

Im Falle einer Bindung von Peptid 46* an SurA sollte die Fluoreszenz deutlich ansteigen und

durch Bindung eines der unmarkierte Peptide an derselben Bindungsstelle wieder reduziert werden. Derartige Kompetitionsstudien sollten eine spezifische Bindung der Peptide 46 und 62 an SurA nachweisen und zeigen, ob beide Peptide mit derselben Bindestelle in SurA interagieren. Diese Versuche wurden mit SurA und SurAN+ICt, beide rekombinant produziert und über Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt, durchgeführt (3.4.3.1, 3.4.4.1, 3.4.4.2). Zunächst wurde die Fluoreszenz der Interaktion zwischen Peptid 46* und unmarkierten Peptiden untersucht. Zu Peptid 46* (400 nM) wurde ein 250-facher Überschuss an unmarkierten Peptiden (100 μ M) gegeben. Die Proben wurden nach Anregung bei 335 nm in einem Spektrum von 350 bis 600 nm als Emission bei etwa 450 nm vermessen (3.5.4.3). Für alle Spektren sind nur relative Fluoreszenzeinheiten (FE) angegeben, da bei verschiedenen Experimenten mit unterschiedlichen Spalt-Einstellungen gearbeitet wurde, um den bestmöglichen Ausschnitt eines Spektrums zu erreichen.

Im Vergleich zur Kontrolle mit Peptid 46* ohne weitere Peptide zeigte sich ein Anstieg der Fluoreszenz in Anwesenheit der unmarkierten Peptide (Abb. 24). Diese war am stärksten in Gegenwart des unmarkierten Peptides 46 ausgeprägt (ca. 360 FE), während die Kurven von Peptid 46* mit den Peptiden 71 (ca. 100 FE) und 62 (ca. 250 FE) eine geringere Fluoreszenz aufwiesen. Aufgrund dieser Befunde wurde die Kombination des Peptides 46* mit unmarkiertem Peptid 46 als Kontrolle eingesetzt, da die Fluoreszenz-Werte der Peptide 62 und 72 mit Peptid 46* unter dem Wert von Peptid 46 mit Peptid 46* lagen.

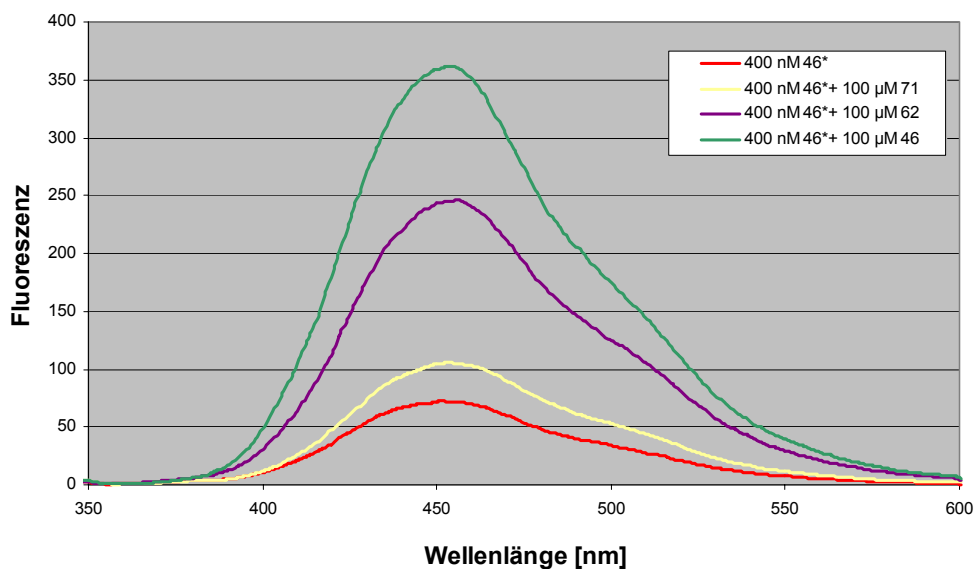


Abb. 24: Interaktion des fluoreszenzmarkierten Peptides 46* mit unmarkierten Peptiden 46, 71 und 62. Die Peptide wurden in F-Puffer für 1 h bei 30 °C inkubiert. Gezeigt ist das Spektrum eines Experimentes, in dem unmarkierte Peptide im 250-fachen Überschuss zum markierten Peptid 46* vorlagen. Wiederholungs-Experimente mit gleichen und variierenden molaren Verhältnissen lieferten qualitativ gleiche Ergebnisse.

Um die spezifische Interaktion zwischen Peptid 46 und SurA zu untersuchen, wurde zunächst ein SurA/Peptid 46*-Gemisch, welches zuvor für 1h bei 30 °C inkubiert wurde, vermessen. Das Protein (400 nM) lag dabei im vierfachen Überschuss zum Peptid (100 nM) vor. Es wurde in Gegenwart von SurA und SurAN+ICt eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz verzeichnet, was auf einen Komplex aus aktivem SurA und Peptid 46* schließen lässt (Abb. 25). Dabei ist der Hintergrund, hervorgerufen durch die Interaktion der Peptide 46 und 46*, als Referenz für die individuellen Spektren zu berücksichtigen. Das Maximum dieser Referenz lag bei ca. 75 relativen Fluoreszenzeinheiten (FE), das Maximum des SurA-Protein/Peptid 46*-Ansatzes bei ca. 180 FE. Zur Untersuchung der Spezifität durch Competition wurden zu den Protein/Peptid 46*-Komplexen die Peptide 46, 62 und 71 im Überschuss von 1:250 zugegeben und für 1h bei 30 °C inkubiert. In Gegenwart des unmarkierten Kompetitors 46 wurde eine signifikante Abnahme der Emission, das so genannte *quenching*, detektiert. Der (Protein/Peptid 46*)+ Peptid 46 Ansatz zeigte ein Maximum bei ca. 105 FE, also ca. 75 FE unter dem Wert des Gemisches ohne kompetitierendes Peptid. Somit lag im Falle der Interaktion von SurA mit Peptid 46 eine spezifische Bindung vor.

Die Zugabe von Peptid 62 und 71 zu dem Protein/Peptid 46*-Komplex ergab keine Änderung der Fluoreszenzmaxima, es wurde also kein *quenching* der Fluoreszenz beobachtet. Dieser Befund lässt den Schluss zu, dass die Anwesenheit der Peptide 71 und 62 offenbar keine Competition des fluoreszenzmarkierten Peptides 46* verursacht. Die Daten für SurA+ICt sind nicht gezeigt, da diese qualitativ mit denen für SurA übereinstimmten

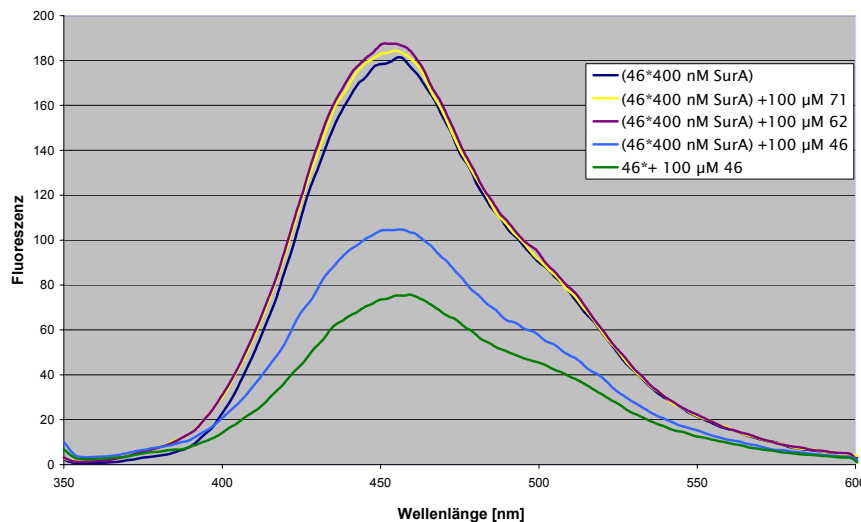
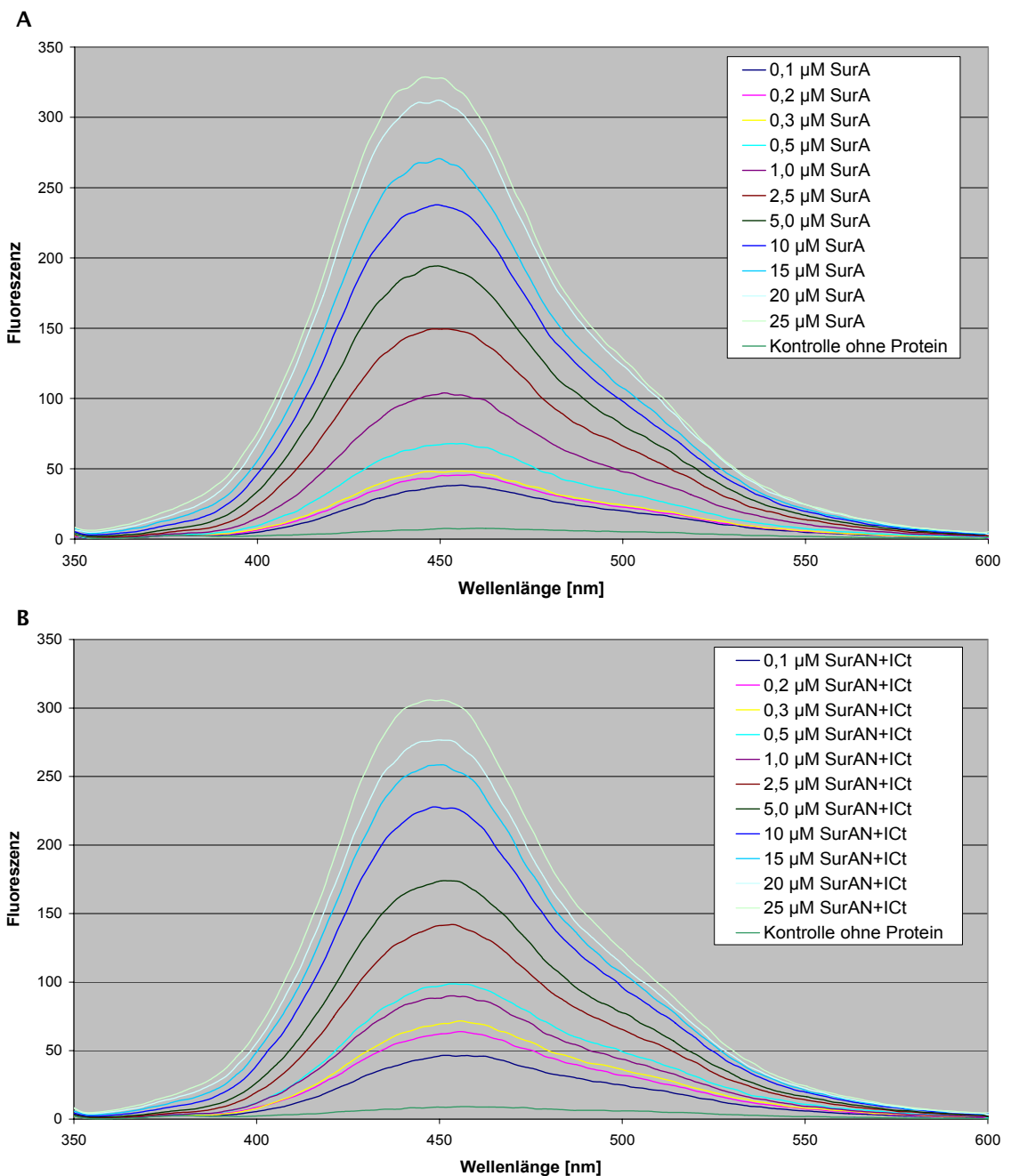


Abb. 25: Spezifität der SurA/Peptid 46*-Interaktion durch Competition mit Peptid 46. Gezeigt sind Fluoreszenzspektren von SurA mit fluoreszenzmarkiertem Peptid 46* mit unmarkierten Peptiden 46, 71 und 62. Protein/Peptid-Komplexe wurden durch Inkubation in F-Puffer für 1h bei 30°C erzeugt und durch Zugabe unmarkierter Peptid und weiterer Inkubation für 1h bei 30°C die Fähigkeit zur Competition mit dem markierten Peptid 46* untersucht. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Peptid 46 und 46*, das ein zu berücksichtigendes Hintergrundsignal (ca. 75 FE) lieferte. Der Komplex aus SurA und Peptid 46* (ca. 180 FE) konnte nur durch Peptid 46 (ca. 105 FE), nicht durch 62 und 71 kompetitiert werden.

Zur Untersuchung der Affinität der Interaktion zwischen SurA und Peptid 46 * wurde eine fluoreszenzspektroskopische Messung mit ansteigender SurA-Konzentrationen bei konstanter Peptid Konzentration durchgeführt. In Anlehnung an die SPR-Experimente (siehe 4.1.8) wurde hierzu SurA und SurAN+ICt in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 25 μM in Anwesenheit von 100 nM für Peptid 46* vermessen. Die Ansätze wurden für 1h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle diente 100 nM Peptid 46* ohne Protein, welches ein Spektrum mit sehr geringer Emission verursachte und als vernachlässigbarer Hintergrund betrachtet wurde. Sowohl für SurA als auch SurAN+ICt wurde mit steigender Konzentration eine relative Zunahme der Fluoreszenz-Emission beobachtet (Abb. 26).



Fortsetzung nächste Seite

Abb. 26: Bestimmung der Affinität der Interaktion zwischen Peptid 46* und SurA-Proteinen. Ansteigende Konzentrationen (wie angegeben) von SurA (A) und SurAN+ICt (B) wurden mit 100 nM Peptid 46 für 1h bei 30°C inkubiert. Die Ansätze wurden spektroskopisch vermessen und die Fluoreszenz-Maxima bei 450 nm registriert. Die Experimente wurden je SurA-Variante zweimal durchgeführt. Gezeigt ist jeweils das Ergebnis eines Versuches.

Allerdings liegen die Maxima für jede SurAN+ICt-Konzentration geringfügig tiefer als bei SurA. Dies ließe sich zum einen durch eine im Vergleich SurA verminderte Affinität zu Peptid 46*, möglicherweise durch verminderte Stabilität des Proteins verursacht, zum anderen durch eine schlechtere Qualität der betreffenden SurAN+ICt-Präparation, erklären. Bei zunehmender Erhöhung der Proteinkonzentration sollte eine Sättigung der Protein/Peptid-Interaktion eintreten, so dass kein weiterer oder nur ein verminderter Anstieg der Fluoreszenz zu erwarten wäre. Die Fluoreszenzmaxima wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und eine Kurve durch die erhaltenen Punkte gelegt, die die Berechnung der Sättigung durch Extrapolation ermöglicht. Dadurch kann die SurA-Konzentration errechnet werden, bei der ein Gleichgewicht zwischen Peptid-Assoziation und Dissoziation vorliegt (3.5.4.3). Der halbmaximale Wert dieser Konzentration liefert die Gleichgewichts-Konstante K_D . Die Berechnung ergab K_D -Werte der SurA/Peptid 46*-Interaktion von 3,5 bis 7 μM für SurA, während SurAN+ICt mit 5 bis 9 μM geringfügig weniger affin war (Abb. 27).

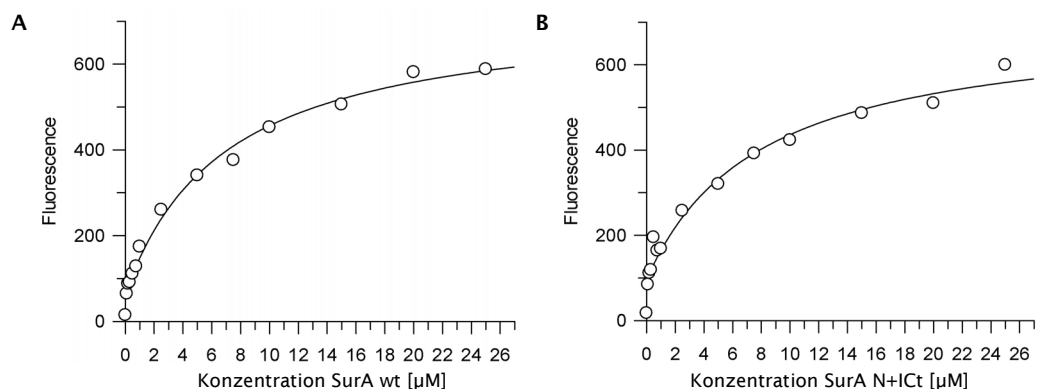


Abb. 27: Bestimmung der Gleichgewichts-Konstante K_D von SurA (A) und SurAN+ICt (B) mit Peptid 46* aus der LamB-Bibliothek. Aufgetragen wurden maximale Fluoreszenz-Werte einer Protein-Konzentrationsreihe gegen die Konzentration der Proteine. Durch Extrapolation der Kurven und *fitting* wurden K_D -Werte bestimmt (3.5.4.3). Die Experimente wurden dreimal je Protein durchgeführt, die K_D lag bei 3,5–7 μM für SurA und 5–9 μM für SurAN+ICt.

Die hier durchgeführten fluoreszenzspektroskopischen-Studien zur Interaktion zwischen SurA bzw. SurAN+ICt und Peptid 46 zeigen sowohl die Spezifität als auch die Affinität dieser Interaktion. Die erhaltenen Gleichgewichts-Konstanten der Komplexe aus SurA bzw. SurAN+ICt und Peptid 46* liegen in der gleichen Größenordnung wie die mittels SPR-Spektroskopie gemessene Affinität von Peptid 46 zu SurAN+ICt ($K_D = 2 \mu\text{M}$) und stimmen mit den Literaturwerten für ähnliche Peptide (1–14 μM ; Bitto und McKay, 2003; 4.1.8) überein.

4.2 Lokalisation von Peptid-Bindestellen auf der Oberfläche von SurA mittels EPR

4.2.1 Auswahl von Resten zur Markierung mit einer Radikalsonde

Bisherige Befunde dieser Arbeit zur Substratspezifität von SurA ergaben, dass zwei wesentliche Merkmale – Muster aromatischer Aminosäuren und die Orientierung ihrer Seitenketten – eine selektive Erkennung von Peptiden durch SurA ermöglichen. Aufgrund der identifizierten SurA-bindenden Muster kann zwar auf Positionen in den *Porinen*, aber nicht unmittelbar auf Bindestellen in *SurA* selbst geschlossen werden. Eine potentielle Substratbindestelle in SurA wurde in der Spalte, lokalisiert im N- und C-terminalen Bereich von SurA, angenommen (Bitto und McKay, 2002, 2003), da diese Spalte in der Kristallstruktur als Bindestelle für Helix 6 eines benachbarten SurA-Moleküls identifiziert wurde. Dadurch wäre, allein durch die Ausmaße der Spalte bedingt, eine Voraussetzung für eine Bindung von Peptiden gegeben. Der Bereich um den Eingang zum „Tunnel“, bestehend aus dem N- und C-terminalen Bereich sowie der PI-Domäne von SurA, bildet eine leichte Mulde, die ebenfalls als möglicher Ort der Substratbindung betrachtet wurde.

Um zu untersuchen, wo die aus den Durchmusterungsverfahren erhaltenen Peptide an SurA binden, wurde die Methode der *electron paramagnetic resonance* (EPR) herangezogen. Hierzu sollten zunächst Cystein-Reste ortspezifisch (Pfeiffer *et al.*, 1999) auf der Oberfläche von SurA eingeführt und mit einer Radikalsonde markiert werden. Im Falle einer Bindung eines Peptides in räumlicher Nähe zu der Radikalsonde ist, als Zeichen verringerter Mobilität der Radikalsonde, eine Verbreiterung des EPR-Spektrums zu erwarten (3.5.1). Auch eine Konformationsänderung des SurA Moleküls, hervorgerufen durch eine Interaktion mit einem Peptid, würde zu einer Veränderung des Spektrum führen (Wegener *et al.*, 2001).

Die Auswahl der Reste, die gegen Cystein ausgetauscht und somit zur Kartierung von SurA herangezogen werden sollten, wurde so getroffen, dass die Seitenketten möglichst exponiert vorliegen. Die Radikalsonde ist einer Interaktion mit Molekülen gegenüber umso empfindlicher, je weniger sie von umgebenden Resten des Proteins beeinflusst wird. Zudem wurden solche Reste gewählt, die nicht zur strukturellen Integrität des Chaperons beitragen. Durch einen Sequenzvergleich von SurA mit homologen Proteinen (siehe Anhang) wurde zudem der Grad der Konservierung berücksichtigt. Nach diesen Kriterien wurden folgende Reste ausgewählt (Tabelle 10):

Tabelle 10: Charakteristika der zum Austausch gegen Cystein gewählten Reste

Position	Aminosäure	Konservierung	Lage in der 3D-Struktur
68	Ser	E//Q/H	Eingang zum Kanal, Anfang von Helix 2
78	Gln	Q/N/T	Eingang Spalte links, Mitte von Helix 2
106	Gln	N/K	Oberer Spaltenrand, Anfang von Helix 4
120	Gln	Q/A/R/E	Oberer Spaltenrand, Ende von Helix 4
191	Gln	V/D/Q	Eingang zum Kanal, Anfang von Helix 7 (PI)
223	Gln	S/P/Q	Zentrum der Spalte links, Helix 9 (PI)
227	Asn	N/K/K	Zentrum der Spalte links, Helix 9 (PI)

In der SurA-Struktur wurden potentielle Reste mit *Insight II* (Accelrys) virtuell gegen Cysteine ausgetauscht und mit MTSSL markiert (Abb. 28). Die Positionen Q78, Q106, Y120, Q223 und N227 decken einen Großteil der Spalte und des „Flügels“ ab (Abb. 28A), so dass die Radikalsonde im Falle einer Bindung von Peptiden in dem Bereich des Flügels beeinflusst werden sollte. Dabei ist die Radikalsonde am Anfang (Q106) und am Ende (Y120) der flügelbildenden Helix 4 wenig immobilisiert, so dass die Sonden an diesen Positionen relativ sensitiv sein sollten. Auf der gegenüberliegenden Seite des „Flügels“, an der aus N-Terminus und PI-Domäne gebildeten Wand sind die Reste Q223C und N227C mit MTSSL markiert. Aus der Struktur wird ersichtlich, dass das MTSSL an Position 223 am Boden der Spalte liegt, so dass das Sauerstoffatom der Nitroxid-Gruppe nach oben orientiert ist. Die Radikalsonde an N227C schmiegt sich der Innenwand der Spalte an und ist vermutlich etwas mobiler als die Sonde am Boden der Spalte. Am Eingang der Spalte, an der Helix 2 in Position 78, liegt eine weitere Sonde. Diese ist allerdings von vielen benachbarten Resten verdeckt, so dass hier wenig Mobilität zu erwarten ist. Jedoch könnten auch Konformationsänderungen, bedingt durch Interaktion mit einem Peptid und den daraus resultierenden lokalen oder globalen strukturellen Änderungen, den Immobilisierungsgrad möglicherweise verringern (Svensson *et al.*, 1995; Hubbell *et al.*, 1998).

Der andere Bereich, der virtuell mit der Radikalsonde markiert wurde, lag um den Eingang des Tunnels (Abb. 28B). Die dort gewählten Reste waren H68 und Q191. Die Radikalsonde an Rest H68C ist in einer kleinen Mulde, gebildet durch Helix 9 (PI), Helix 2 (N-Terminus) und der C-terminalen Helix, lokalisiert. Die Sonde liegt flach auf den von PI gestellten Bereich am Eingang des Tunnels. Der Grad der Immobilisation ist hier vermutlich recht gering. Ebenso sollte das MTSSL an Rest Q191C, der sehr frei in die Mulde zum Tunnel ragt, wenig immobilisiert sein. Dieser Bereich um den Tunneleingang könnte Aufschluss über etwaige Interaktionen der Peptide mit SurA in dieser Region geben.

Schließlich könnte es durch den Austausch der genannten Reste zur Verminderung oder sogar zum Verlust der Chaperonaktivität kommen. Dieses könnte ebenfalls Aufschluss über Ort der Interaktionsfläche geben und wäre ein gewünschter Nebeneffekt der Cys-Mutagenese.

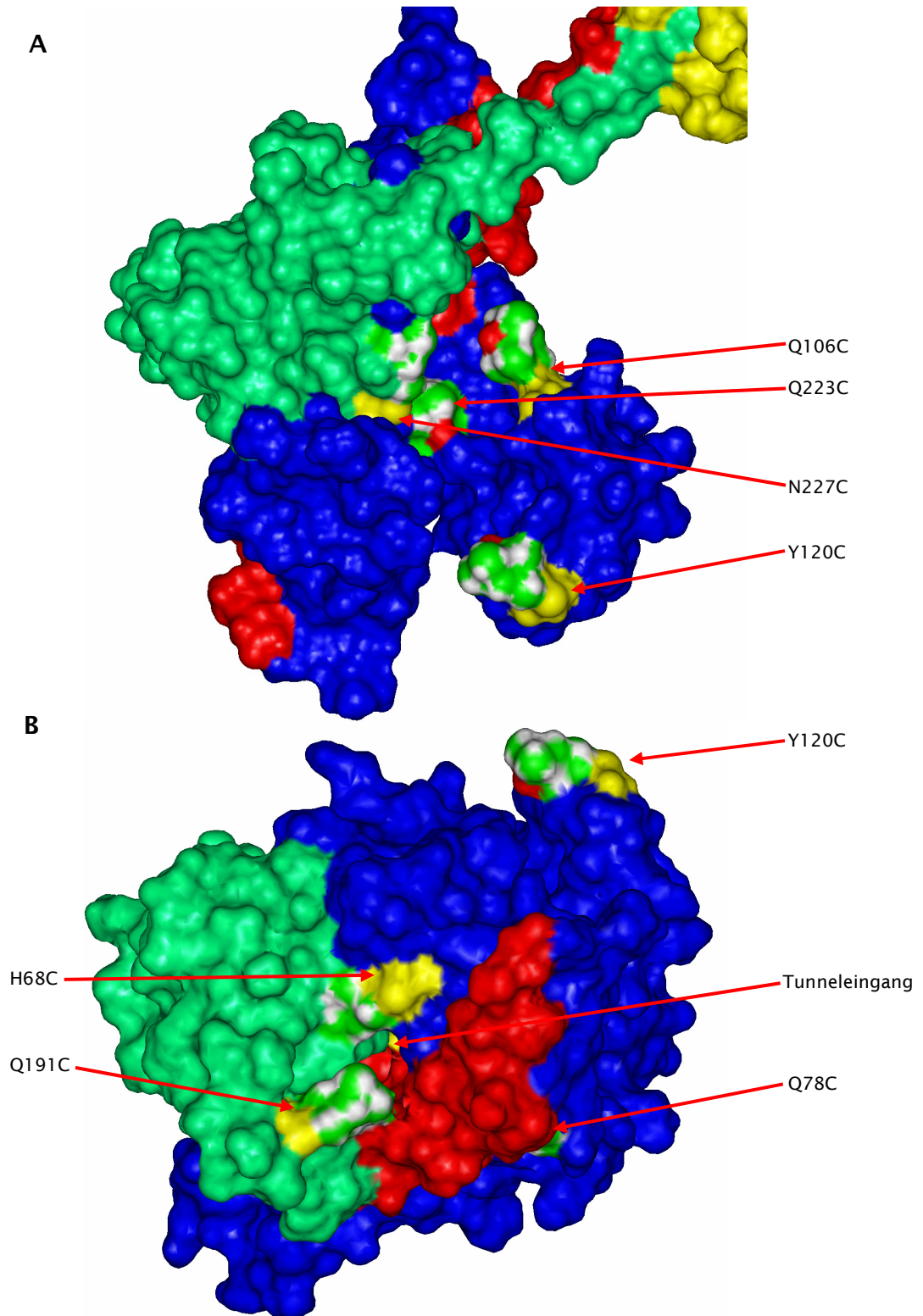


Abb. 28: Position MTSSL markierter Reste in der Kristall-Struktur von SurA (PDB-Nummer: 1M5Y unter www.rcsb.org/pdb, Bitto & McKay, 2002) mit virtuell ausgetauschten und MTSSL-markierten Cystein. (A) Sicht auf die Spalte mit den markierten Resten Q106C, Y120C, Q223C und N227C. (B) Sicht auf Mulde mit Tunneleingang, längs zur Molekülachse mit den MTSSL markierten Resten H68C, Q78C, Y120C und Q191C. Farbgebung: N-Terminus blau, PI-Domäne grün, PII-Domäne gelb, C-terminale Helix rot, MTSSL weiß/grün mit rotem Punkt (wenn sichtbar) und Cysteinreste gelb

4.2.2 Generierung von SurA-Cys-Proteinen und Bestimmung der Chaperon-artigen Aktivität

Auf DNA-Ebene wurden die Kodons der Reste Q78, Q106C, Q223 und N227 durch *quick change mutagenesis* (QCM)-PCR in der für SurA kodierenden Sequenz der Plasmide pASKSurA*SacI* oder pHKToxRSurA gegen Cystein-Kodons ausgetauscht (3.3.5). Die dazu definierten Oligonukleotide enthielten TGC oder TGT Kodons und wurden zu einer *quick change mutagenesis* (QCM)-PCR eingesetzt (3.3.5). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit *Dnpi* verdaut, dialysiert und kompetente *E.coli* Zellen (BMH 71-18) mit 1,5 µl des PCR-Ansatzes transformiert (3.3.1, 3.1.5). Die Plasmide erhaltener Klone wurden isoliert und sequenziert (3.3.3.3, 3.2.8.2, 3.2.2.1, 3.2.7, 3.3.4 und 3.2.3.2). Die drei N106C, Q223C und N227C enthaltene *surA*-Abschnitte wurden mit den Restriktionsenzymen *PstI/HindIII* aus pHKToxRSurA geschnitten, gereinigt und in den entsprechend präparierten pASKSurA*SacI* Vektor kloniert (3.3.1, 3.1.4, 3.2.6, 3.2.8.1, 3.2.8.2, 3.2.4, und 3.3.2). Durch Sequenzanalyse wurden die jeweiligen Nukleotid-Austausche verifiziert. Kompetente Zellen des Expressionsstammes CAG44102 wurden mit den entsprechenden Plasmiden transformiert (3.1.1, 3.1.2 und 3.1.4).

Für die EPR-Studien wurde die Radikalsonde (1-oxyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrroline-methyl) Methanthiosulfonat (MTSSL) mit einem ungepaarten Elektron am Stickstoff der Nitroxidgruppe benutzt (3.5.1). Die Reinigung und Markierung der jeweiligen SurA-Cys-Proteine erfolgte nach Protokoll (3.4.3.1 und 3.4.4.1, 3.5.2.1; Kweon *et al.*, 2003 und Qin & Squier, 2001). Alle SurA-Cys-Proteine bildeten über Disulfidbrücken mehr oder weniger ausgeprägte Mengen an Dimeren aus. Die Proteine wurden daher im immobilisierten Zustand mit 1 mM DTT-Lösung reduziert, gewaschen und anschließend, noch auf der Säule befindlich, mit MTSSL inkubiert (3.5.2.1). Die so hergestellten, mit MTSSL markierten Proteine wurden über Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt (3.4.4.2), um Dimere und Verunreinigungen abzutrennen, und anschließend zur Messung von EPR-Spektren eingesetzt. SurA-Cys-Proteine, die nicht mit dem reaktiven MTSSL markiert gewesen sein sollten, obwohl die Cys-Reste für die Radikalsonde zugänglich waren, wären vermutlich als Dimere bei diesem Schritt der Reinigung entfernt worden, so dass hier eine recht homogene Lösung aus markierten SurA-Cys-Proteinen vorliegen sollte.

Um zu untersuchen, ob durch das Einführen von Cystein-Resten und der Radikalsonde die Aktivität der SurA-Proteine beeinflusst war, wurde die Chaperon-artige Aktivität der mit MTSSL markierten Proteine mittels Analyse der thermalen Aggregation von Citrat-Synthase bestimmt (3.5.4.1; Buchner *et al.*, 1998). Aktives SurA ist in der Lage die thermale Aggregation von Citrat-Synthase zu unterdrücken (Behrens *et al.*, 2001). Die SurA-Cys-Proteine wurden im Überschuss (1,2 µM zu 0,15) zur Citrat-Synthase gegeben und der Verlauf der Aggregation der

Citrat-Synthase fluoreszenzspektroskopisch verfolgt. Abb. 29 zeigt den Verlauf der Aggregation der Citrat-Synthase als Zunahme der Lichtstreuung. Als Kontrolle sind die Aggregationsverläufe der Citrat-Synthase ohne Zusatz weiterer Proteine (Kontrolle Citrat-Synthase) bzw. in Anwesenheit von BSA (Kontrolle BSA) gezeigt. Ein Vergleich beider Kurven (\pm BSA) zeigt, dass BSA die thermale Aggregation der Citrat-Synthase zu einem gewissen Grad unterdrücken kann.

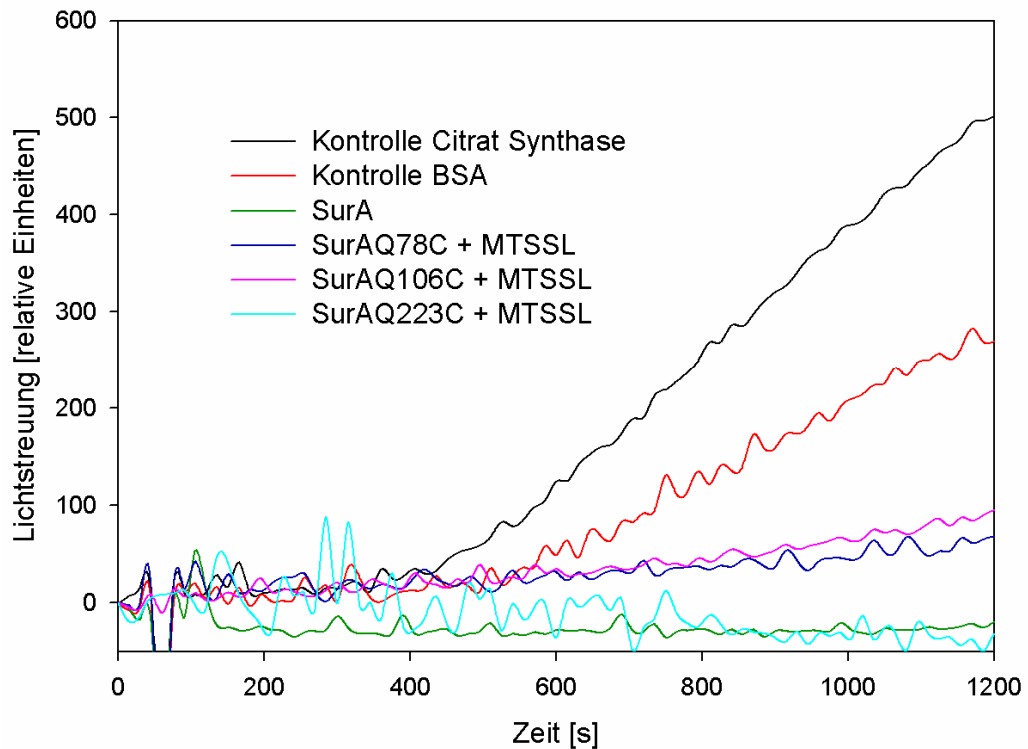


Abb. 29: Unterdrückung der thermalen Aggregation von Citrat-Synthase ($0,15 \mu\text{M}$) bei 43°C (pH 7,5) durch SurA- und Cys-Proteine (jeweils $1,2 \mu\text{M}$). Wildtyp-SurA und SurAQ223C + MTSSL unterdrücken die thermale Aggregation der Citrat-Synthase vollständig, SurAQ78C mit MTSSL und SurAQ106C + MTSSL nahezu vollständig. BSA unterdrückt die thermale Aggregation der Citrat-Synthase teilweise. Die Messungen wurden mehrfach durchgeführt. Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs.

Wildtyp-SurA hemmt die thermale Aggregation vollständig, erkennbar an der unveränderten Basislinie, die auch nach Zugabe der Citrat-Synthase nicht ansteigt. Ähnlich verhalten sich die SurA-Proteine Q78C, Q106C und Q223C, die eine Reduktion der relativen Lichtstreuung auf unter 100 FE bewirken. Somit wurde die Aggregation, verglichen mit der Kontrolle ohne SurA, in allen Fällen zu mindestens 80 % gehemmt. Dieser Befund zeigt, dass die MTSSL-markierten SurA-Proteine Q78C, Q106C und Q223C Chaperon-artige Aktivität besitzen.

Die Aktivität von SurAN227C + MTSSL wurde in Gegenwart von Peptid 46 und 71 gemessen, welche im doppelt molaren Überschuss zum Protein vorlagen (Abb. 30). Als Referenz wurde die Aggregationshemmung der Peptide allein berücksichtigt. Unerwartet war dabei die Beobachtung hoher Hemmwirkung von SurAN227C auf die thermale Aggregation in Gegenwart von Peptid

46 (ca. 80 FE). In Anwesenheit des Klasse I-Peptides wäre eine verringerte Fähigkeit des SurA-Proteins zur Unterdrückung der Aggregation der Citrat-Synthase zu erwarten, da Peptid und Citrat-Synthase um die Bindung an SurA kompetitieren müssen. Ebenso beachtlich waren die Werte für die Lichtstreuung der Ansätze mit Peptid 46 und 71 allein. Diese liegen bei ca. 200 FE, was der Aggregationsunterdrückenden-Wirkung von BSA (ca. 250 FE) nahe kommt.

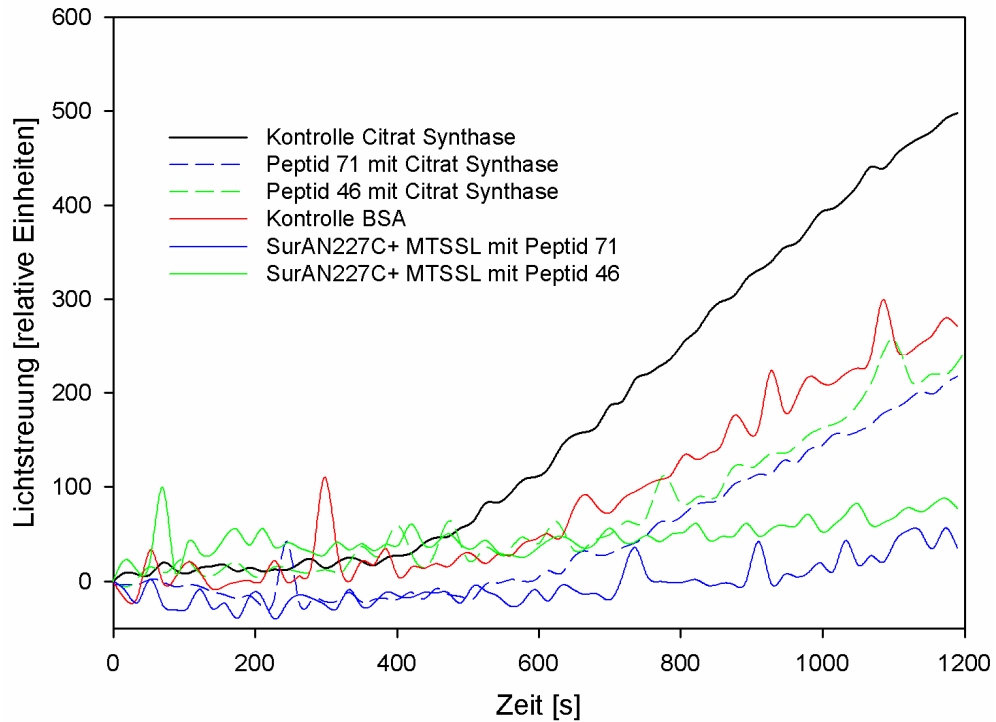


Abb. 30: Unterdrückung der thermalen Aggregation von Citrat-Synthase ($0,15 \mu\text{M}$) bei 43°C (pH 7,5) durch SurAN227C ($1,2 \mu\text{M}$) mit Peptiden 46 und 71 (je $2,4 \mu\text{M}$). SurAN227C unterdrückt die Aggregation fast vollständig, selbst in Gegenwart eines doppelten Überschusses an Peptid 46, ebenso verhält sich SurAN227C mit Peptid 71, dem Klasse III-Peptid der LamB-Bibliothek. Die Aggregationsunterdrückende-Wirkung der Peptide 46 und 71 ist der von BSA ähnlich. Die Messungen wurden mehrfach durchgeführt. Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs.

Diese Ergebnisse belegen, dass der Austausch von Aminosäuren an den gewählten Positionen gegen Cystein und die Markierung mit MTSSL keinen detektierbaren Einfluss auf die Fähigkeit von SurA zur Unterdrückung der thermalen Aggregation der Citrat-Synthase hat. Die MTSSL-markierten Sur-Cys-Proteine besitzen daher Wildtyp-ähnliche Chaperonaktivität. Da die Kurven zudem ein recht hohes Hintergrundrauschen aufweisen, sind die geringen Abweichungen von der Aggregationsunterdrückenden-Wirkung des Wildtyps, z.B. bei Q78C und Q106C, nicht signifikant. Die leicht verminderte Aktivität von Q78C und Q106C kann zudem auch von chargenspezifischen Unterschieden herrühren. Allerdings kann auch eine proteolytische Degradation der Citrat-Synthase im Meßansatz eine Aggregationsunterdrückung vortäuschen. Es konnte jedoch für keine der SurA-Präparationen eine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden (3.5.4.2, Daten nicht gezeigt).

4.2.3 Einfluss von Peptiden der Peptid-Bibliotheken auf ortsspezifische Sonden in SurA-Cys-Proteinen

Die MTSSL-markierten SurA-Proteine wurden EPR-spektroskopisch in Gegenwart der Peptide 46 und 71 untersucht. Zunächst wurde freies MTSSL vermessen, um ein Referenz-Spektrum zu erhalten (3.5.2.2; Abb. 31).

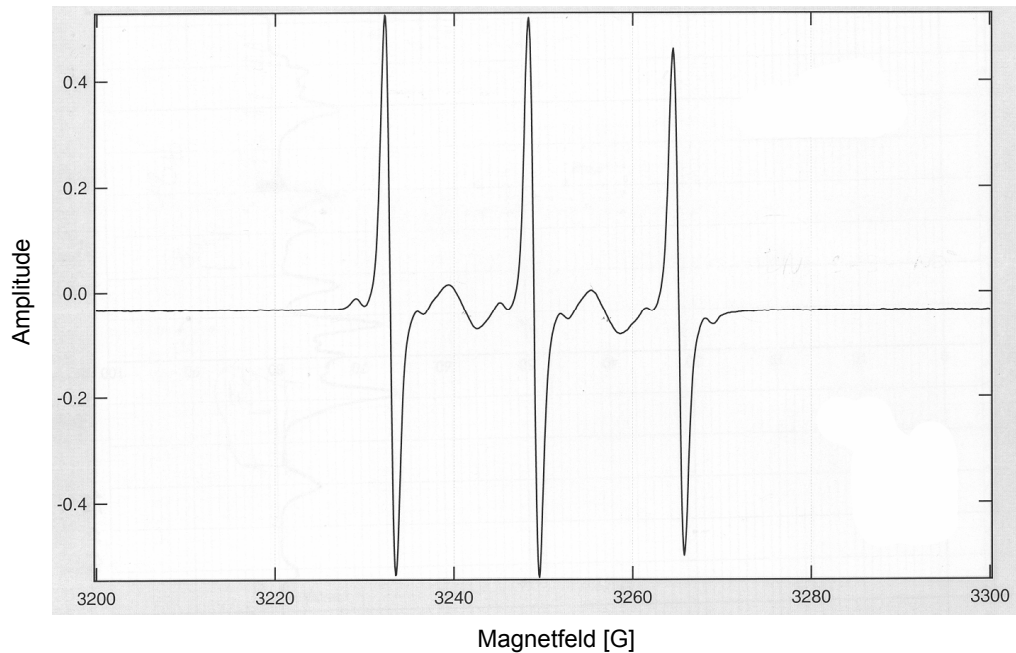


Abb. 31: Typisches Triplett-Spektrum des ungepaarten Elektrons am Stickstoff der Nitroxid-Gruppe in freier Lösung in Puffer A, pH 6,7. Verstärkungsfaktor 2000, Zentrum des Spektrums 3240, Magnetfeld 3195 bis 3295 G.

Das in Lösung befindliche MTSSL zeigt die charakteristischen drei *peaks* des freien Elektrons der Nitroxid-Gruppe. Indikativ für den mobilen Zustand sind die Abstände, die *peak to peak* Distanzen zwischen den mittleren und äußeren *peaks* sowie die Höhe der äußeren *peaks* im Vergleich zum mittleren *peak* (Atkins, 1990).

Eine Vergrößerung des *peak to peak* Abstandes (Abstand mittlerer *peak* zu äußeren *peaks*) in Verbindung mit einer geminderten *peak*-Höhe, lässt auf eine verringerte Mobilität des Elektrons schließen (Steinhoff, 1988). Anschließend wurde der Erfolg der MTSSL-Markierung der SurA-Cys-Proteine (Q78C, Q106C, Q223C, N227C) mittels EPR-Spektroskopie untersucht. Die markierten SurA-Cys-Proteine wurden in Konzentrationen von 50 bis 150 μM bei 9,118 GHz mit 5 bis max. 20 mW Mikrowellen Leistung bei Raumtemperatur bestrahlt (3.5.2.2). Zur Aufnahme des EPR-Spektrums wurde ein Magnetfeld von 3195 bis 3295 Gauß (G) angelegt und die erhaltenen Kurven auf Verbreiterung bzw. Abflachen der *peaks* untersucht. Der Grad der Mobilität der Radikalsonde konnte durch Vergleich mit dem Referenz-Spektrum des freien Moleküls ermittelt werden.

Für alle SurA-Cys-Proteine, außer für SurAQ223C (Abb. 32C), konnte eine deutliche

Immobilisierung der Radikalsonde beobachtet werden. Die SurAQ223C Variante lieferte in mehreren Versuchen kein EPR-Spektrum, sondern nur unspezifisches Rauschen, welches selbst bei höchster Verstärkung nicht auf ein MTSSL-Signal schließen lässt. Dies deutet darauf hin, dass die Variante SurAQ223C nicht MTSSL-markiert war. Vermutlich war die Seitenkette zu verborgen, um eine Kopplung mit MTSSL zu erlauben. Die Spektren der SurA-Cys-Proteine Q78C, Q106C und N227C (Abb. 32) zeigten eine Verbreiterung und ein Abflachen der äußeren *peaks*, was auf eine verminderte Mobilität der Radikalsonde hindeutet (Hoppe *et al.*, 1982; Hammarström *et al.*, 2001; Steinhoff, 2004).

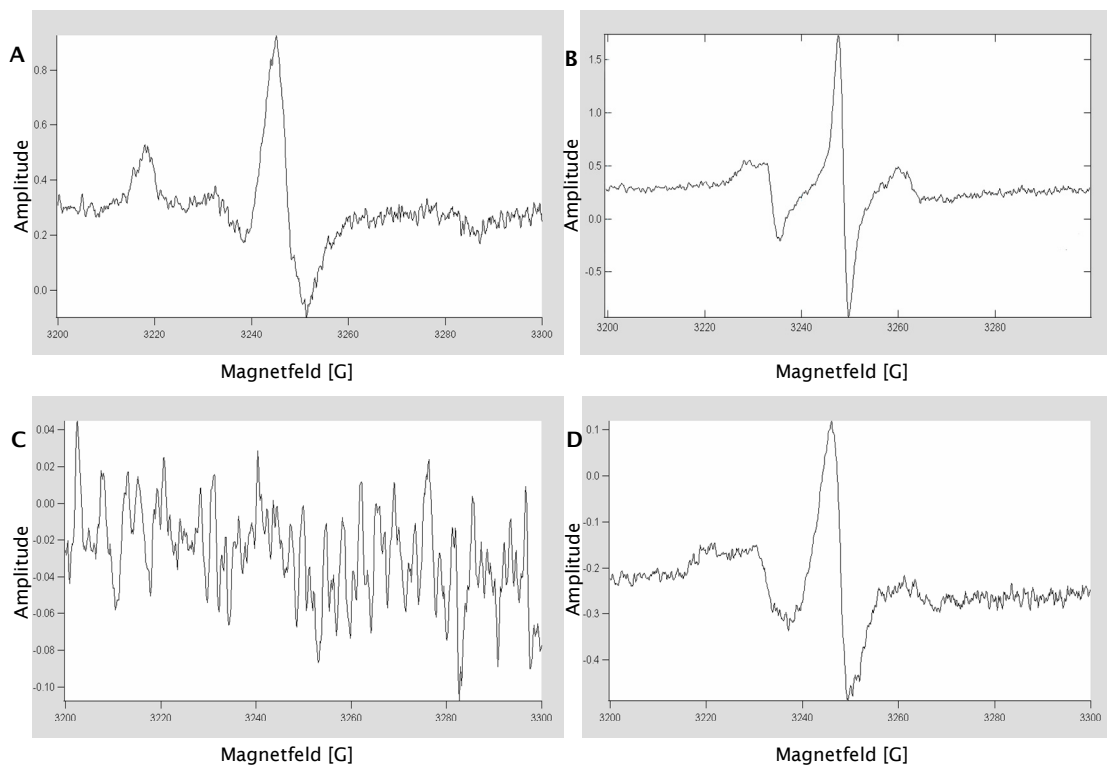


Abb. 32: Ortspezifische Immobilisierung der Radikalsonde MTSSL an unterschiedlichen SurA-Cys-Mutanten, gezeigt am EPR-Spektrum des freien Radikals der Nitroxid-Gruppe. Die SurA-Cys-Mutanten, SurAQ78C (A), SurAQ106C (A), SurAQ223C (C) und SurAN227C (D) wurden mit 1mM MTSSL in Puffer A (pH 6,7) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gereinigt. Alle Mutanten außer SurAQ223C weisen ein starkes EPR-Signal auf, ersichtlich aus dem Mittel-*peak* bei ca. 3245 G und den nach außen verbreiterten Seiten-*peaks*. Selbst bei maximaler Verstärkung um den Faktor 100.000 konnte kein Signal für SurAQ223C erreicht werden. Das Zentrum des Spektrums lag bei 3240, das Magnetfeld reichte von 3195 bis 3295 G. Die Messungen wurden mind. dreimal durchgeführt, gezeigt ist das Resultat einer repräsentativen Messung.

Ähnlich dem Spektrum des freien Radikals, war der Mittel-*peak* bei allen Mutanten außer Q223C noch vorhanden. Jedoch waren, im Vergleich zur Kontrolle, die äußeren beiden *peaks* deutlich niedriger und der Abstand von der Mittel-*peak* zu den rudimentären äußeren *peaks* vergrößert. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die genannten Cystein-Reste mit MTSSL gekoppelt waren und eine ortsspezifische Radikalsonde an der entsprechenden Position auf der

Oberfläche vorlag.

Im Fall von SurAQ78C ist eine relativ starke Immobilisierung aufgetreten, wie aus dem verbreiterten und in der Höhe geminderten Verlauf der Seiten-*peaks* ersichtlich ist. Der Rest 78C ist in der SurA-Struktur am Boden der Spalte lokalisiert und von Resten des unmittelbaren Umfeldes teilweise verdeckt. Das Spektrum von SurAQ106C weist einen etwas anderen Verlauf auf, was aufgrund der Struktur und der damit einhergehenden Immobilisierung zu erwarten ist. Die Seiten-*peaks* sind weniger abgeflacht und näher an den Mittel-*peaks* gelegen, woraus auf eine höhere Mobilität der Sonde geschlossen werden kann. Im Gegensatz zum SurAQ78C-Spektrum ist der Mittel-*peak* im SurAQ106C Spektrum schärfer und zu gleichen Teilen ober- und unterhalb der Basislinie verteilt.

Seiten- und Mittel-*peak* des Spektrums von SurAN227C sind deutlich in Form und Höhe verändert. Die Seiten-*peaks* im Gegensatz zu denen von SurAQ106C-Spektren verbreitert und flacher. Die Mittel-*peaks* liegen überwiegend oberhalb der Basislinie, wie auch bei dem Spektrum von SurAQ78C. Für die Radikalsonde an der Position SurAN227C würde man ein Immobilitätszustand zwischen dem von SurAQ78C und SurAQ106C annehmen, was aus der Lage der Seiten-*peaks* mit einem Hochpunkt bei ca. 3220 G ersichtlich ist, während die Hochpunkte der Seiten-*peaks* für SurAQ78C und SurAQ106C bei 3215 G und 3230 G zu finden sind. Die Mobilität des MTSSL-markierten SurA227C ist, gemäß der Struktur, eingeschränkt, da umliegende Reste recht engen Kontakt zu der Sonde aufweisen. Diese Resultate zeigen, dass in SurA die jeweiligen Cysteinreste außer Q223C für MTSSL zugänglich waren und dass an den ausgewählten Stellen der Immobilisierungsgrad von MTSSL, der unmittelbar auf die Umgebung der Sonde schließen lässt, mit der Kristallstruktur von SurA übereinstimmt.

Die auf MTSSL-Markierung geprüften SurA-Proteine SurAQ78C, SurAQ106C und SurAN227C wurden für Experimente mit löslichen Peptiden eingesetzt. Die Proteine wurden mit einem zweifach molaren Überschuss an Peptid 46 und 71 für 2h bei Raumtemperatur bei pH 6,7 inkubiert und anschließend EPR-spektroskopisch vermessen (3.5.2.2). Die resultierenden Spektren wurden mit der Software IGOR bearbeitet und dabei mit dem Spektrum ohne Peptide verglichen (Abb. 33 und 34).

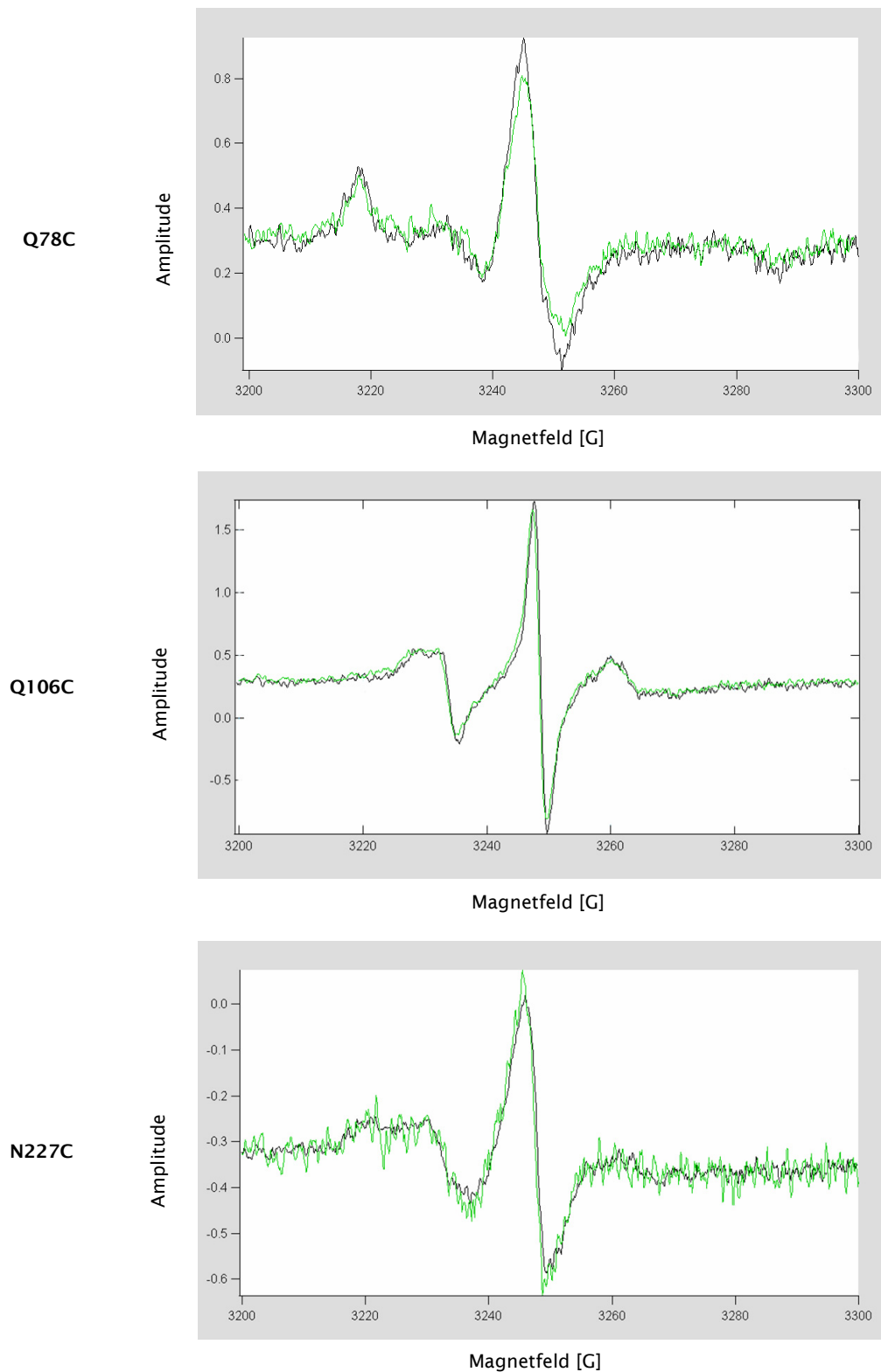


Abb. 33: Einfluss von Peptid 46 auf EPR-Spektren von unterschiedlichen SurA-Cys-Mutanten. Die mit MTSSL markierten SurA-Cys-Mutanten wurden mit zweifach molarem Überschuss an Peptid 46 in Puffer A (pH 6,7) für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. SurAQ78C (Oben), SurAQ106C (Mitte), SurAN227C (Unten). Gezeigt ist das jeweilige Spektrum mit (grün) und ohne Peptid 46 (schwarze Kurve).

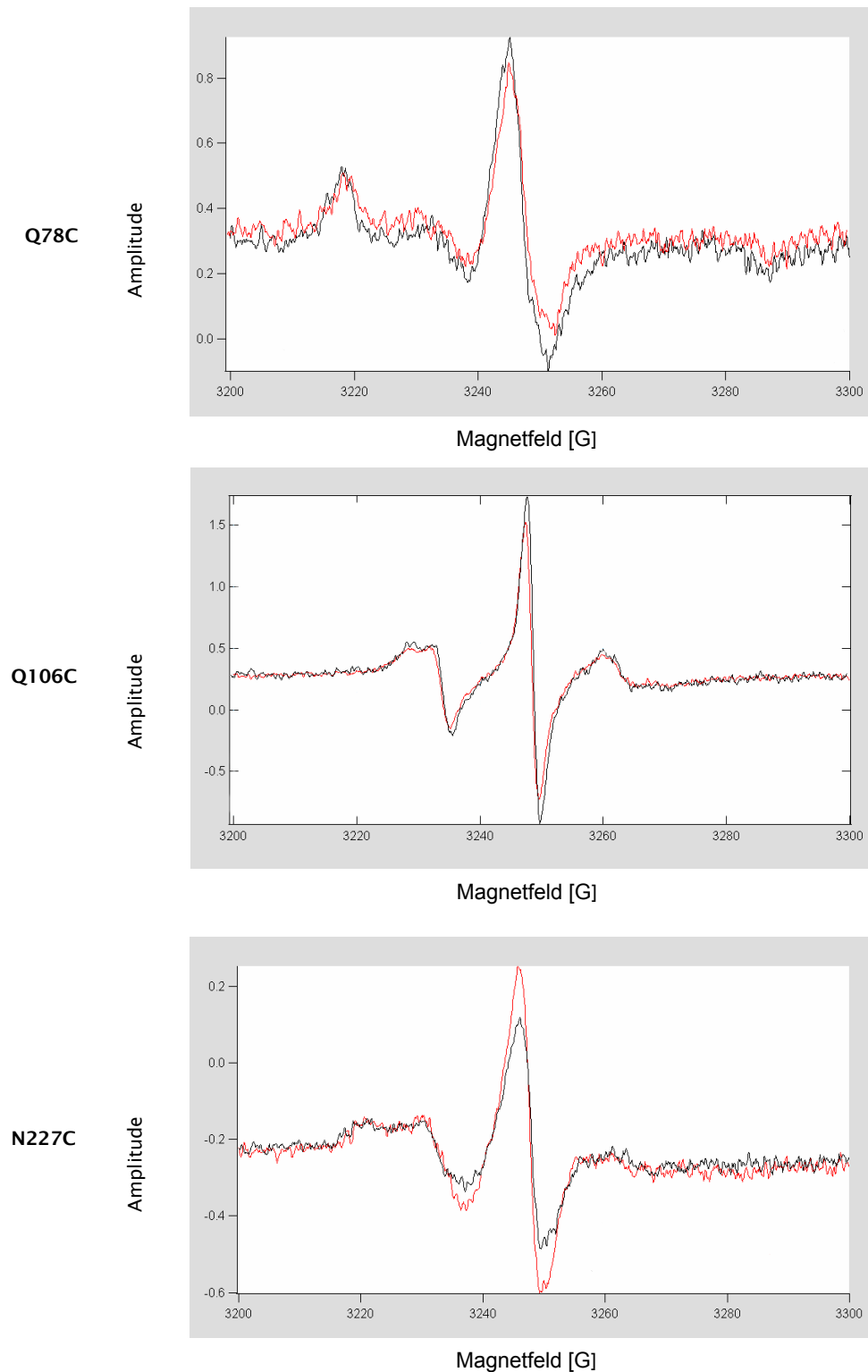


Abb. 34: Einfluss von Peptid 71 auf EPR-Spektren von unterschiedlichen SurA-Cys-Mutanten. Die mit MTSSL markierten SurA-Cys-Mutanten wurden mit zweifach molarem Überschuss an Peptid 71 in Puffer A (pH 6,7) für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. SurAQ78C (Oben), SurAQ106C (Mitte), SurAN227C (Unten). Gezeigt ist das jeweilige Spektrum mit (rot) und ohne Peptid 71 (schwarze Kurve).

Es zeigte sich bei allen Messungen mit Peptid ein dem Spektrum ohne Peptid ähnlicher Kurvenverlauf. Die Abweichungen sind selbst in Gegenwart von Peptid 46, für das eine spezifische Interaktion mit SurA gezeigt wurde, nicht drastisch. Auch das Verwenden eines Puffers mit pH 8.0 als Lösungsmittel für SurA zeigte keine veränderten Kurvenverläufe. Die Spektren von mit MTSSL markiertem SurAQ78C, SurAQ106C und SurAN227C wiesen generell ein geringes Signal-zu-Rausch Verhältnis (Hammerström *et al.*, 2001) auf. Geringe Proteinkonzentrationen sind hierfür ausschlaggebend und die verwendeten Konzentrationen scheinen am unteren Messbereich zu liegen. Aufgrund dieses Befundes sind komparative Analysen der EPR-Spektren, speziell bei geringen Abweichungen der Spektren mit Peptid, nicht immer sehr aussagekräftig. Bei einer Bindung des Peptides im Einflussbereich der ortsspezifischen Sonde wäre eine Änderung der Mobilität zu erwarten. Die Empfindlichkeit, mit der eine Sonde auf Einflüsse aus der Umgebung reagiert, ist direkt vom Immobilisationsgrad abhängig. Daher wäre es möglich, dass eine Interaktion mit dem Peptid nicht detektierbar ist, weil die Sonde bereits zu stark immobilisiert ist.

5 Diskussion

5.1 Zur Identifizierung von SurA-Bindestellen in natürlichen Substraten von SurA

5.1.1 Durchmusterung von Peptid-Bibliotheken zur Analyse der Substratspezifität von SurA

Nach bisherigen Erkenntnissen ist das periplasmatische Chaperon SurA an der Faltung von LamB, OmpF, OmpA sowie anderen OMPs beteiligt (Lazar und Kolter, 1996; Rouvière und Gross, 1996). So konnte bereits die direkte Interaktion von SurA mit LamB, OmpF sowie PhoE durch Ko-Immunopräzipitations-Experimente gezeigt werden (Behrens *et al.*, 2001). SurA ist an einem frühen Schritt der Biogenese von LamB, der Bildung von Faltungsintermediaten (f-Monomeren) aus ungefalteten Monomeren, beteiligt (Rouvière und Gross, 1996). Aus einer zufällige Peptid-Heptamere präsentierenden Phagen-Bibliothek wurde die Sequenz Ar-polar-Ar-unpolar-Pro- (Ar = F, W oder Y) als mögliche Erkennungssequenzen für SurA identifiziert (Bitto und McKay, 2003). Diese Sequenzen sind unter den natürlichen Substraten jedoch sehr selten oder, wie im Fall der OMPs LamB, OmpF und OmpA, gar nicht vertreten, so dass dieser Ansatz vermutlich nur bedingte Aussagen zur Substratspezifität von SurA zulässt. Aber welche molekularen Charakteristika besitzt ein natürliches Substrat von SurA und wodurch unterscheiden sich SurA-Substrate von anderen Proteinen, beispielsweise von periplasmatischen Proteinen? Bislang sind keine Einzelheiten über die Lokalisation der Bindestellen in SurA oder in den Substraten bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nach der Substratspezifität von SurA und der Lokalisation von Bindestellen, sowohl in SurA als auch in den Substraten, nachgegangen.

Die Analyse der Substratspezifität von SurA wurde mittels Durchmusterung Zellulosegebundener Peptid-Bibliotheken, die alle potentiellen Bindestellen von drei biologisch relevanten Substraten präsentieren, durchgeführt. Die Substrate, aus denen die Sequenzen der Peptid-Bibliotheken stammen, sind die trimeren Porine LamB und OmpF sowie das monomere OmpA. Die Peptid-Bibliotheken wurden mit zwei SurA-Varianten, Wildtyp-SurA und SurAN+ICt, inkubiert und es konnte eine Bindung beider Proteine an identische Peptide detektiert werden. Bindende Peptide waren über die ganze Bibliothek verteilt und es wurden in einigen Bereichen Abfolgen benachbarter Peptide gefunden, die von SurA erkannt wurden. Diese Abfolgen benachbarter Peptide lassen auf eine diesen Peptiden gemeinsame SurA-Bindestelle schließen. Der Befund, dass nur wenige Peptide von SurA-Proteinen erkannt wurden, zeigt, dass SurA-Proteine offensichtlich zwischen verschiedenen Aminosäureseitenketten unterscheiden.

5.1.2 Charakteristika SurA-bindender Peptide

Die auf Bindung mit SurA durchmusterten Peptide wurden zum einen entsprechend ihrer Affinität zu SurA klassifiziert, zum anderen wurde ein theoretisch bester Binder jeder Bibliothek nach Kluck *et al.* (2002) ermittelt. Bei der Peptid-Klassifizierung wurden Peptide mit starker (Klasse I), mittlerer (Klasse II) und geringer (Klasse III) Affinität zu SurA ermittelt. Die zusätzlichen statistischen Analysen zur kumulativen Häufigkeit von Aminosäuren und theoretisch besten Bindern (4.1.4) zeigten, dass die zur Klassifizierung der Peptide gewählte Grenze (40 % und 60 % der *spot*-Intensität) zur Ermittlung der Substratspezifität von SurA hinreichend und angemessen war.

In der Gruppe der Klasse I+II-Peptide wurde im Gegensatz zu Klasse III-Peptiden ein deutlich erhöhter Anteil von aromatischen Aminosäuren gefunden, ebenso fielen die theoretisch besten Binder durch überdurchschnittlich viele aromatische Aminosäuren auf. Aus dem hohen Anteil an aromatischen Aminosäuren wurde auf eine Präferenz von SurA für mit aromatischen Aminosäuren angereicherte Peptide geschlossen. Übereinstimmend mit Befunden von Webb *et al.* (2001), die eine Bindung von SurA an ein Somatostatin-Peptid unabhängig von der Gegenwart von Prolin gezeigt haben, wurde ferner keine Anreicherung von Pro und somit keine bevorzugte Interaktion mit Prolin-haltigen Peptiden festgestellt. Dieses Resultat zeigt, dass die aktive PPIase-Domäne (PII) nicht für die Bindung an die Peptide benötigt wird. Die inaktive PPIase-Domäne (PI) könnte durchaus Peptide mit Pro binden. Somit sind die beobachteten Bindungsspezifitäten von SurA PPIase-unabhängig und auf die Chaperon-artige-Aktivität, die im N- und C-Terminus von SurA lokalisiert ist (Behrens *et al.*, 2001), zurückzuführen. In diesem Zusammenhang wäre der Beitrag der PI-Domäne zu der Bindung an die bei der Durchmusterung gefundenen bindenden Peptide zu untersuchen. Wenn die PI-Domäne direkt oder indirekt (z.B. durch Stabilisierung der N-Ct-Regionen) an der Bindung an die Bibliotheks-Peptide beteiligt ist, sollte das SurAN-Ct-Protein, dem die PI-Domäne fehlt, bei der Durchmusterung von Peptid-Bibliotheken ein anderes Bindemuster als SurA-Proteine mit PI-Domäne aufweisen. Da es aus den EPR- und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen Hinweise auf mindestens zwei Bindestellen in SurAN+ICt gibt (5.1.3), könnte man vermuten, dass die PI-Domäne selbst eine Bindestelle für Peptide darstellt oder zumindest teilweise an einer solchen beteiligt ist. Man könnte sich beispielsweise eine Substratbindestelle, die von der N- und C-terminalen Region und der PI-Domäne gebildet werden, und eine zweite, die nur in dem NCt-Bereich lokalisiert ist, vorstellen.

Im Unterschied zu den Peptid-13meren der Peptid-Bibliotheken, ist die Aminosäurezusammensetzung der von Bitto und McKay untersuchten Peptid-Heptamere (Bitto und McKay, 2003) eher untypisch für OMPs. Die Heptamere weisen einen deutlich erhöhten Anteil an Prolin auf und sind im Verhältnis zu aromatischen Aminosäuren (13,1 % Prolin und 7,9 %

aromatische Aminosäuren) anders als die hier verwendeten 13mere (2,86 % Prolin und 12,3 % aromatische Aminosäuren) zusammengesetzt. Dadurch kann das Auftreten von Prolin in Bindern einfach durch die Überrepräsentation dieser Aminosäure in den Heptameren zustande kommen.

Neben der Anreicherung wurden auch spezielle Anordnungen aromatischer Aminosäuren gefunden. Es wurde in Klasse I+II-Peptiden eine im Vergleich zu Klasse III-Peptiden gesteigerte Häufigkeit des Ar-x-Ar- oder Ar-Ar-Motives (4.1.5, Tabelle 7), das oft mit einer weiteren flankierenden aromatischen Aminosäure auftrat, gefunden. In Verbindung mit der flankierenden aromatischen Aminosäure umfassen einige gebundene Sequenzen bis zu elf Aminosäuren. Mit den in *phage display* Experimenten untersuchten Peptid-Heptameren, die zwar ein Ar-x-Ar-Motiv tragen und kompetitiv von SurA gebunden wurden (Bitto und McKay, 2003; 2004), können Muster dieser Länge nicht gefunden werden. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass selbst die in dieser Arbeit durchmusterten Peptid-13mere nur Teile einer größeren, noch komplexeren Bindungssequenz, die mehr als 13 Aminosäuren umfasst, sind.

Das postulierte Bindemotiv Ar-polar-Ar-unpolar-Pro (Bitto und McKay, 2003) ist sehr selten in OMPs und gar nicht in den hier untersuchten natürlichen SurA-Substraten zu finden. Es wurden in dieser Arbeit nur zwei überlappende Peptide mit einem Ar-x-Ar-Motiv und einem Prolin in entsprechender Distanz gefunden. Selbst das Ar-x-Ar-Motiv alleine ist offensichtlich nicht ausreichend, um eine spezifische Bindung durch SurA zu gewährleisten. Denn es wurden in den Bibliotheken nur wenige Peptide mit einem Ar-x-Ar Motiv ohne flankierende aromatische Aminosäure von SurA gebunden. Es konnte jedoch eine gewisse Präferenz von SurA für polare Reste in der zweiten Position des Ar-x-Ar-Motives bestätigt werden, da 88 % aller Klasse I+II-Peptide entsprechende Aminosäuren in dieser Position aufwiesen.

Es wurde im Vergleich zu periplasmatischen Proteinen, eine leichte Erhöhung der Häufigkeit des Ar-x-Ar Motivs in OMPs, wie in der Literatur beschrieben (Bitto und McKay, 2003), gefunden. Jedoch ist das Ar-Ar Motiv offensichtlich nicht typisch für OMPs, da es mit unerwartet niedriger Frequenz auftritt und im Vergleich zu periplasmatischen Proteinen nicht signifikant angereichert ist. Trotzdem wurde das Ar-Ar Motiv oft in bindenden Peptiden gefunden und könnte möglicherweise Teil eines komplexeren Erkennungsmusters für eine SurA-Bindung darstellen. Eine mögliche Ursache für das geringe Auftreten der Ar-Ar-Sequenz in OMPs könnte zudem sein, dass viele OMPs aus einer transmembranen und einer periplasmatischen Proteinregion bestehen und beide Regionen eine gemäß ihrer Funktion unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung aufweisen (Buchanan, 1999).

Ein erhöhtes Vorkommen des Ar-x-Ar Motivs ist aber offensichtlich nicht ausreichend, um die Bindung von SurA zu gewährleisten. Das periplasmatische Protein MalE enthält genauso viele Ar-x-Ar Motive pro hundert Aminosäuren wie OMPs und das sogar mit einer höheren als der

erwarteten Frequenz. Das deutet darauf hin, dass zusätzlich zu den aromatischen Mustern eine für OMPs typische Eigenschaft den Unterschied bei der Substraterkennung durch SurA ausmacht. Dieser Unterschied könnte in der Struktur der OMPs, die sich in den Transmembranbereichen generell durch β -barrels auszeichnet, liegen. Dadurch weisen die meisten Sekundärstrukturen β -Stränge auf, was im Zusammenspiel mit den gefundenen aromatischen Mustern mindestens zwei aromatische Seitenketten auf einer Seite und eine dritte auf der gleichen oder der gegenüberliegenden Seite des Stranges ausrichten würde. Da Glu und Pro, beide als Brecher von β -Strang-Strukturen bekannt (Chou und Fasman, 1974), in SurA-bindenden Peptiden abgereichert sind, wird die Hypothese zur Präferenz solcher Sekundärstrukturen gestützt.

Die Peptid-13mere der Bibliotheken waren C-terminal auf der Zellulosemembran verankert und es ist zu berücksichtigen, dass diese Peptide bezüglich der Sekundärstruktur vermutlich nicht die exakte *in vivo* Konformation der ungefalteten Substrate aufweisen. Die Peptide stellen nur Sequenzabschnitte der Polypeptidkette dar, die *in vivo* zu beiden Seiten von weiteren Aminosäuren flankiert werden. Die Sekundärstruktur dieser Bereiche ist stark von den Einflüssen dieser flankierenden Bereiche abhängig. Zwar decken sich die vorhergesagten Sekundärstrukturen der Peptide fast immer mit denen im nativen Protein vorliegenden Konformationen, dennoch ist nicht auszuschließen, dass die Peptide der Porin-Bibliotheken, ob der fehlenden Restriktionen von Nachbarsegmenten der Polypeptidkette, eine andere als die *in vivo* vorliegende Sekundärstruktur aufweisen. Da SurA in einem recht frühen Schritt der Porin-Biogenese Kontakt mit den Substraten hat (Rouvière und Gross, 1996), ist es nur schwer einzuschätzen, welche tatsächliche Sekundärstruktur zu diesem Zeitpunkt *in vivo* vorliegt.

Die vorhergesagte Sekundärstruktur des von Webb *et al.* (2001) auf Interaktion mit SurA untersuchten Somatostatin-Peptides (AGSKNFFWKTFTSS), das ein komplettes Muster ohne Prolin enthält, ist ebenfalls β -Strang. Für einen Teil der Klasse I- und Klasse II-Peptide wurde jedoch keine β -Strang Konformation sondern eine *random coil* Struktur vorhergesagt (39 % in Klasse I und 29 % in Klasse II). Es könnte ein *induced fit* Mechanismus postuliert werden, der die zur Interaktion mit SurA erforderliche Ausrichtung der Aminosäureseitenketten auch in diesen Peptiden ermöglicht. Da die α -helikalen Strukturen in Klasse I-Peptiden abgereichert sind, ist hier zu vermuten, dass diese Struktur die zur Bindung bevorzugte Ausrichtung der aromatischen Aminosäuren nicht immer zulässt. Die vorhergesagten α -Helices, die dennoch unter den Bindern gefunden wurden, zeigten allerdings in der *Helical-Wheel* Vorhersage eine Ausrichtung von mindestens zwei aromatischen Seitenketten auf der gleichen oder der gegenüberliegenden Seite der Helix, so dass auch hier wieder die bevorzugte Ausrichtung der Seitenketten erfüllt ist.

Die bisherigen Befunde lassen den Schluss zu, dass zur selektiven Substraterkennung durch SurA zwei Voraussetzungen erfüllt werden müssen: Erstens, ein Muster, bestehend aus

einem aromatischen Basismotiv (Ar-x-Ar oder Ar-Ar) und idealerweise einer weiteren flankierenden aromatischen Aminosäure und Zweitens, die Orientierung zweier aromatischer Seitenketten auf einer Seite und einer weiteren aromatischen Aminosäure auf der gleichen oder der gegenüberliegenden Seite des Peptides. Diese Bedingungen sind besonders in OMPs erfüllt, da die aromatischen Motive, im Gegensatz zu anderen Proteinen, überwiegend in β -Strängen auftreten, wodurch die Aminosäureseitenketten entsprechend ausgerichtet sind.

Bei der Durchmusterung der Peptid-Bibliotheken sind, wie bereits erwähnt, Abfolgen benachbarter bindender Peptide, wie beispielsweise Peptide 42 – 49 und 130 – 136 in der LamB, 53 – 57 und 105 – 111 in der OmpF sowie 9 – 12 und 21 – 25 in der OmpA-Bibliothek, beobachtet worden. Solche Abschnitte lassen darauf schließen, dass eine Bindestelle für SurA in mehreren benachbarten Peptiden vorhanden ist, und dort die für die Erkennung und Bindung relevanten Determinanten zu suchen sind. Da es sich aber bei der Auswertung und Klassifizierung der Peptide um ein statistisches Verfahren, handelt sind hier in allen Klassen „Ausreißer“ beobachtet worden, die nicht immer exakt dem postulierten Schema zur Bindung durch SurA entsprechen. Möglicherweise handelt es sich bei den „Ausreißern“ in Klasse I und II um unspezifisch bindende Peptide oder es gibt noch bisher unbekannte Faktoren, die ebenfalls eine Bindung beeinflussen. Anhand von einigen Peptiden wird im Folgenden auf mögliche „Ausreißer“ eingegangen.

Die in den Positionen 41 – 49 der LamB-Bibliothek vorhandenen Peptide zeichneten sich beispielsweise durch einen relativ hohen Gehalt an aromatischen Aminosäuren und hohe relative Affinitäten zu SurA aus (Tabelle 11).

Tabelle 11: Sequenzanalyse überlappender Peptide der LamB-Bibliothek
Aromatische (A) und geladene (\pm) Aminosäuren sowie Prolin (P) sind hervorgehoben.

Aminosäuresequenz	Muster	vorherg.Sekundärstruktur	Affinität [%]
41. PGSTIWAGKRFYQ	PxxxxAxx++AAx	CCCCCCCCCCCC	< 40
42. TIWAGKRFYQRHD	xxAxx++AAx+A-	CCCCCHHHCCCC	\geq 40
43. AGKRFYQRHDVHM	xx++AAx+A-xxx	CCCCCHHHCCCC	< 40
44. RFYQRHDVHMIDF	+AAx+A-xxxx-A	CCCCCCEEECCC	\geq 60
45. QRHDVHMIDFYW	x+A-xxxx-AAAA	CCCCEEEEEEECC	\geq 60
46. DVHMIDFYWDIS	-xxxx-AAAA-xx	CCCEEEEEEEECC	\geq 60
47. MIDFYWDISGPG	xx-AAAA-xxxPx	CEEEEEEECCCC	\geq 60
48. FYYWDISGPGAGL	AAAA-xxxPxxxx	CEEECCCCCCCC	\geq 60
49. WDISGPGAGLENI	A-xxxPxxxx-xx	CCCCCCCCCCCC	< 40
60. SSFASNNIYDYN	xxAxxxxA-Axx	CCCCCCCCCCCC	< 40
61. ASNNIYDYNETA	xxxxA-Axx-xx	CCCCECCCCCCC	< 40
62. NIYDYNETANDV	xxA-Axx-xxx-x	CCCCCCCCCCCC	\geq 60
63. DYTNETANDVFDV	-Axx-xxx-xA-x	CCCCCCCCCCCC	< 40

Die Peptide 41 – 44 und 45 – 49 der LamB-Bibliothek enthalten jedoch unterschiedliche aromatische Muster. Während in den Peptiden 41 – 44 ein Ar-x₄-Ar-Ar und Ar-Ar-x₂-Ar Muster (Muster 3, siehe 4.1.5) sowie eine positive Nettoladung vorhanden ist, zeigen die Peptide 45 – 49 ein Ar₄ Muster (Muster 1, siehe 4.1.5). Auffällig erscheint bei den Peptiden 45 – 48 der Gehalt an negativ geladenen Resten, die den Peptiden eine negative Nettoladung vermitteln. Das Verhältnis von negativ geladener zu aromatischen Aminosäuren ist nur bei Peptid 46 > 0,67, bei den Peptiden 45, 47 und 48 liegt es unter 0,67. Dennoch wurde Peptid 46 von SurA gebunden und als Klasse I-Peptid eingestuft. Obwohl die Peptide 41 und 43 ein vollständiges Muster tragen, sind die Affinitäten gerade unter der 40 % Grenze (Peptid 41 = 35,15 % und Peptid 43 = 39,38 %). Die relativ geringe Affinität des Peptides 41 könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass das Ar-Ar Motiv C-terminal lokalisiert ist. Dies könnte die Zugänglichkeit für SurA einschränken und die Bindung beeinflussen (4.1.5). Peptid 42, das über der 40 % Affinitäts-Hürde liegt, weist eine zusätzliche aromatische Aminosäure und dadurch zwei Muster auf (Ar-x₄-Ar-Ar und Ar-Ar-x₂-Ar), was möglicherweise die gesteigerte Affinität erklären könnte. Ebenso wie Peptid 42 weist auch Peptid 43 eine vorhergesagte α -helikale Sekundärstruktur auf, Peptid 43 ist jedoch als Klasse III-Peptid (< 40 %) eingestuft worden. In den Peptiden 44 – 49 mit hohen Affinitäten zu SurA liegen die aromatischen Seitenketten in einem vorhergesagten β -Strang, was eine Ausrichtung der Aminosäureseitenketten in gegenständiger Orientierung erlaubt. Allerdings weisen die Peptide 45 – 49 auch negative Nettoladung auf, die in diesem Fall die Affinität offensichtlich nicht beeinträchtigt.

Als „Einzelbinder“ bezeichnete Peptide sind auffällig, da diese keine gebundenen Nachbarpeptide besitzen und somit ein Bindungsmotiv im benachbarten Peptid entweder gar nicht oder nicht mehr vollständig enthalten sein sollte oder eine die Bindung störende Determinante hinzukommt. Ein Beispiel ist Peptid 62 (Tabelle 11) aus der LamB Bibliothek, das ein Ar-x-Ar Motiv trägt und in Klasse I eingestuft wurde. Die Peptide 60 und 61 tragen ebenfalls das Ar-x-Ar Motiv, sind jedoch nur in Klasse III zu finden. Das Peptid 62 stellt eines der wenigen Beispiele für ein Peptid, das nur mit dem Ar-x-Ar Motiv (ohne vollständiges aromatisches Muster) gebunden wurde, dar. Dieser Befund wirft die Frage auf, warum nicht Peptid 60 oder 61 gebunden wurden. Nach bisherigen Erkenntnissen zum Verhältnis negativ geladener zu aromatischen Aminosäuren erfüllen Peptid 60 (0,33) und 61 (1,0) dieses Bindungskriterium besser als Peptid 62 (1,5). In Peptid 60 ist zudem ein vollständiges aromatisches Muster (Ar-x₄-Ar-x-Ar) vorhanden. Möglicherweise sind noch unbekannt, die Bindung beeinflussende Faktoren vorhanden. Es wäre auch denkbar, dass das Peptid 62 unspezifisch von SurA gebunden wird und dass das Ar-x-Ar Motiv dabei keine Rolle spielt.

Fluoreszenzspektroskopische Studien (4.1.9) liefern Hinweise auf eine Bindung von Peptid 62 an eine andere Bindungsstelle von SurA als die Peptid-46-Bindungsstelle. Folglich

wäre eine zweite, möglicherweise unspezifische Bindestelle, die durch Peptid 62 besetzt wird, anzunehmen.

5.1.3 Zur Bindungsaffinität und Bindungsspezifität ausgewählter Peptide

Die bei der Durchmusterung der Peptid-Bibliotheken beobachtete Bindung von SurA an einzelne Peptide wurde durch SPR-Spektroskopie mit zwei ausgewählten Peptiden der LamB-Bibliothek verifiziert. Dazu wurden ein Klasse I-Peptid mit hoher Affinität (Peptid 46) und Klasse III-Peptid mit nicht detektierbarer Affinität (Peptid 71) auf Interaktion mit SurAN+ICt untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Klasse I-Peptid im Vergleich zum Klasse III-Peptid eine höhere Affinität zu SurAN+ICt besaß und dass die Gleichgewichtskonstante dieser Bindung bei 2 μM lag. Dabei wurde mittels *online subtraction* die Netto-Affinität der Bindung von SurA an Peptid 46, abzüglich der unspezifischen Interaktion von SurA mit Peptid 71, ermittelt. Die gemessene K_D von ca. 2 μM entspricht den in der Literatur beschriebenen Werten für ähnliche Peptide (siehe 4.1.8).

Durch Fluoreszenzspektroskopie wurden ebenfalls die Affinität und zusätzlich die Spezifität der Bindung ausgewählter Peptide an SurA analysiert. Für beide mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid 46* untersuchten SurA-Proteine, SurA und SurAN+ICt, konnte durch Konkurrenz mit einem unmarkierten Peptid gleicher Aminosäuresequenz eine spezifische Bindung von Peptid 46 nachgewiesen werden. Der Komplex aus SurA und Peptid 46* ließ sich durch Zugabe von Peptid 71 und 62 nicht beeinflussen. Somit binden die Peptide 71 (TLELGVDYGRANL) und 62 (NIYDYTNETANDV) nicht, bzw. nicht an derselben Stelle an SurA wie Peptid 46. Dass aber bei der Durchmusterung der Peptidbibliotheken eine Bindung von Peptid 62 und bei der SPR-Spektroskopie eine gewisse Interaktion von Peptid 71 mit SurA beobachtet wurde, deutet auf eine zweite möglicherweise unspezifische Kontaktstelle in SurA hin. So wäre es denkbar, dass eine Substratbindestelle, die auch von Peptid 46 besetzt wird, für affine und spezifische Interaktionen mit Peptiden zuständig ist, während eine zweite Kontaktfläche recht unspezifisch zunächst einige Peptide, beispielsweise über die Bereitstellung hydrophober Bereiche, bindet und die Peptide somit womöglich vorselektiert.

Die mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid 46* erhaltenen Gleichgewichts-Konstanten von SurA und SurAN+ICt lagen mit Werten von 3,5 – 7 μM für SurA und 5 – 9 μM für SurAN+ICt in der gleichen Größenordnung wie die K_D von SurAN+ICt mit Peptid 46, die mittels SPR-Spektroskopie bestimmt wurde. Zudem stimmen diese Affinitätswerte mit denen aus der Literatur (1 – 14 μM) für ähnliche Peptide überein (Bitto und McKay, 2003; Bitto und McKay, 2004). Es wurde somit durch zwei unabhängige Methoden, SPR- und Fluoreszenzspektroskopie, die Affinität von SurA-Proteinen zu Peptid 46 aus der LamB-Bibliothek und über die Fluoreszenz-Spektroskopie zusätzlich auch die spezifische Bindung des Peptides 46 an SurA gezeigt. Die beobachteten *spot*-Intensitäten und die damit korrespondierenden Affinitäten

zu den mit SurA inkubierten Peptiden liegen in dem aus der Literatur erwarteten Affinitätsbereich. Das zeigt, dass die in dieser Arbeit verwendeten OMP-Bibliotheken zur Ermittlung der Substratspezifität durchaus geeignet waren.

5.1.4 Lokalisation der putativen SurA-Bindestellen in der nativen Struktur der OMPs

Ein überwiegender Teil der in den Peptiden beobachteten SurA-Bindestellen liegt in der nativen Struktur von LamB, OmpF und OmpA in Transmembranregionen. Diese Regionen sind reich an aromatischen Aminosäuren, bedingt durch die *aromatic belts* und im Falle von LamB der *greasy slide* im Inneren der Pore (Seshadri *et al.*, 1998; Schulz, 2000; Van Gelder *et al.*, 2002). Ebenso weist *loop* L3, der bei den Porinen in die Pore zurückfaltet und dadurch den Durchmesser der Pore bestimmt, eine Anreicherung von aromatischen Aminosäuren auf. Die Stränge S1 und S3, die in LamB und OmpF Teil der Kontaktfläche der Trimeruntereinheiten darstellen, weisen in allen drei Proteinen SurA-Bindestellen auf. Die Bereiche der β -barrels der nativen Trimere (S4 bis S9 in LamB und S7 bis S11 in OmpF), die größtenteils der Außenmembran zugewandt sind, enthalten nur wenige putative SurA-Bindestellen. Ähnlich wie bei löslichen Proteinen, bei denen die Chaperon-Bindestellen im Inneren der nativen Struktur verborgen sind (Gething und Sambrook, 1992; Brandon und Tooze, 1999), wären die SurA-Bindestellen an der Kontaktfläche mit der Außenmembran, der Zentral-Pore sowie an der Interaktionsfläche der Trimeruntereinheiten ebenfalls für SurA unzugänglich. Somit würde SurA die Monomere durch Bindung an der Kontaktfläche der Trimeruntereinheiten vor einer frühzeitigen Interaktion schützen und Bereiche, die eher zur hydrophoben Lipiddoppelschicht ausgerichtet sind, weitgehend frei lassen.

Bei OmpA, das aus einer transmembranen β -barrel Region (1 – 173) und einer periplasmatischen (174 – 325) Region aufgebaut ist (4.1.7, siehe Abb. 22), konnten putative SurA-Bindungsstellen in Strang 1 und 3 des β -barrels beobachtet werden. Am Ende des β -barrels von OmpA in Strang 8 und in dem anschließenden periplasmatischen Bereich, der kurz hinter der Prolin-reichen „Scharnierregion“ liegt sind ebenfalls SurA-bindende Motive zu finden. Die „Scharnierregion“ stellt die Verbindung zwischen dem β -barrel und der periplasmatischen Region dar. Durch die Bindung von SurA an dem Übergang zwischen der periplasmatischen und transmembranen Domäne wäre während der Faltung vermutlich eine ungehinderte Ausbildung der zwei Domänen begünstigt.

Im Fall von LamB wurde eine komplette Bindung von SurA an zwei aromatische Muster des *loop* 3 verzeichnet. Aufgrund der besonderen Rolle dieses *loops*, der den Durchmesser der inneren Pore bestimmt (Van Gelder *et al.*, 2002), ist diese Beobachtung sehr interessant. Dabei ist speziell Tyr 118, das zum einen Teil des aromatischen Musters in L3 ist, zum anderen den Durchmesser der Pore bestimmt und einen hydrophoben Kontakt mit Maltodextrinen stellt

(Dutzler *et al.*, 1996), hervorzuheben. Es wäre denkbar, dass *loop* 3 durch Interaktion mit SurA zunächst vor frühzeitigen Kontakten mit dem sich bildenden β -*barrel* und der Lipiddoppelschicht bewahrt und zusätzlich die Insertion in die Pore zeitlich verzögert wird. Dadurch wäre eine korrekte Insertion in das dann gebildete *barrel* vorstellbar. Unklar ist jedoch, durch welche Parameter ein solcher Ablauf genau gesteuert ist und was letztendlich zur Freisetzung von SurA führt. Hier sind weitere Experimente zur Aufklärung der tatsächlichen SurA-Interaktionsstellen in den Substraten und zum Ablauf des Trimerisierungs- und Insertionsprozesses notwendig.

5.2 Zur Identifizierung von Substrat-Bindungsstellen in SurA

5.2.1 Auswahl von Positionen in SurA zur ortsspezifischen Mutagenese

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit war die Suche nach Substratbindestellen in SurA. Dazu sollten bestimmte Regionen der Chaperonoberfläche, speziell der aus N- und C-Terminus bestehende Bereich, mittels EPR-Spektroskopie in Anwesenheit bindender Peptide kartiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Primärsequenz von SurA keine Cysteine aufweist, ist dieses Chaperon für das sogenannte *site-directed spin labeling* (SDSL) geeignet (Oh *et al.*, 1999; Columbus und Hubbell, 2002). Die für diese Methode verwendete Radikalsonde (MTSSL) sollte über Thiole ortsspezifisch an SurA geheftet werden. Zunächst wurden in SurA die Positionen, die zum Austausch gegen Cystein herangezogen werden sollten, bestimmt. Alle Reste wurden gemäß ihrer Zugänglichkeit, ihrer Konservierung sowie der resultierenden Mobilität der Radikalsonde ausgewählt.

Als Ort der Substratbindung in SurA postulierten Bitto und McKay, aufgrund von Vermessungen der Kristallstruktur und Bindung der Helix 6 eines benachbarten SurA-Moleküls im Kristall, die Spalte im *core*-Molekül (Bitto und McKay, 2002 und 2003). Diese Vertiefung wird von den Helices H1 – H5 des N-Terminus sowie der C-terminalen α -Helix gebildet und weist auf dem Boden eine Länge von ca. 50 Å auf (siehe Abb. 28). Die obere Öffnung der Spalte hat eine Länge von ca. 20 Å und eine Breite von ca. 15 Å, die aus dem Durchmesser der dort im Kristall gebundenen Helix 6 hervorgeht. Eine gewisse Flexibilität des löslichen SurA-Moleküls in diesem Bereich und somit eine variable Breite der Spalte ist jedoch nicht auszuschließen.

Aufgrund der Bindung der Helix 6 eines Nachbarmoleküls in dieser Spalte im SurA-Kristall und aufgrund ihrer Ausmaße wurde sie als mögliche Substrat-Bindetasche postuliert. Daher wurden Aminosäuren in diesem Bereich (Q78, Q106, Y120, Q223 und N227) zum zunächst virtuellen Austausch gegen Cys und anschließend die Reste Q78, Q106, Q223 und N227 zum tatsächlichen Austausch gegen Cystein und zur Markierung mit MTSSL ausgewählt.

Der Abstand von Position 106 zu 120, die gesamte Helix 3 abdeckend, beträgt ca. 20 Å und die Position 227 liegt etwa in der Mitte auf der gegenüberliegenden Seite, so dass ein in die Spalte

inserterendes Peptid mindestens eine der zwei Sonden (Q106 oder N227) beeinflussen sollte. Die Sonden an den Positionen 106 sowie 227 sind aufgrund der zu erwarteten Mobilität die empfindlichsten Kandidaten. Die Radikalsonden an den Positionen 78 und 223 sind, wie aus dem virtuell mit MTSSL markierten SurA-Molekül ersichtlich (4.2.1, siehe Abb. 28), eher weniger mobil. Dennoch könnten die Sonden in dieser Position Hinweise auf strukturelle Änderungen des Chaperons geben. Sollte sich die Struktur von SurA durch die Bindung von Peptiden an SurA ändern, könnten sich auch die Einflüsse der Umgebung auf die Radikalsonde ändern. Es wurde bereits bei anderen Proteinen beobachtet, dass die Sonde in ihrem Immobilitätsgrad aufgrund von Interaktionen mit bindenden Molekülen beeinflusst wird, was anhand des EPR-Spektrums durch veränderte Positionen und Höhe der Seiten-*peaks* detektierbar ist (Persson *et al.*, 1999; Steinhoff, 2004).

Neben der Spalte wurde auch eine Mulde am Boden im Bereich des Tunneleingangs (Abb. 35) des SurA-Moleküls als möglicher Ort der Substratbindung in Betracht gezogen und dort die Reste H68 (Helix 1) und Q191 virtuell gegen Cys ausgetauscht. Im Falle von MTSSL-markiertem Q191C ist aus der Struktur zu entnehmen, dass der Eingang zum Tunnel durch die Sonde verdeckt ist. Dadurch könnten über die Bestimmung der Chaperon-artigen Aktivität möglicherweise zusätzliche Informationen zur Rolle dieses Tunnels gewonnen werden.

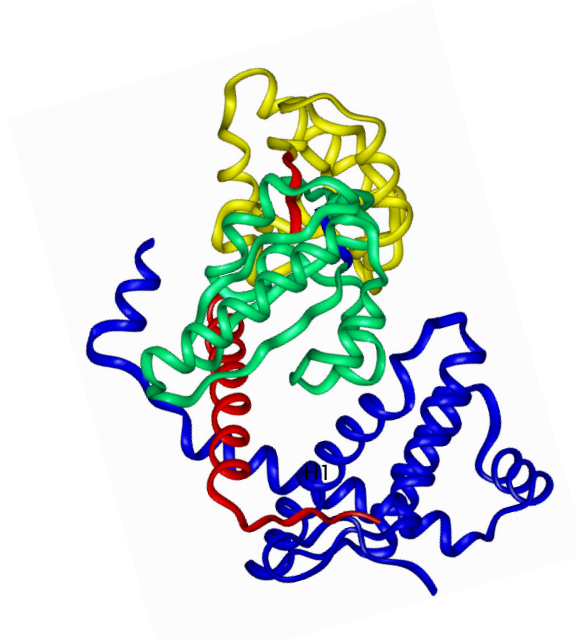


Abb. 35: Sicht längs zur Molekülachse von SurA auf die Mulde, bestehend aus N- und C-Terminus sowie der PI-Domäne (erzeugt mit *InsightII* aus PDB-Nummer 1M5Y unter www.rcsb.org/pdb, Bitto & McKay, 2002)

In Position 68, in der Mitte der Helix 1 lokalisiert, ist ein geringer Immobilisierungsgrad der Sonde und eine gute Abdeckung der Mulde durch das MTSSL zu erwarten. Sollte im Bereich dieser Position eine Interaktion von SurA mit einem Peptid stattfinden, sollte dieses im EPR-

Spektrum sichtbar werden.

Unter Berücksichtigung der Möglichkeit einer Substratbindung durch intermolekulare Kontakte zwischen zwei oder mehreren SurA-Molekülen, könnten noch weitere Bindestellen in Frage kommen. Beispielsweise wäre ein „Einklemmen“ von Substraten durch zwei oder mehr Chaperone denkbar. Die Anzahl möglicher Orte für diese Bindestellen wäre sehr hoch und schwer abzusehen. Die SurA-Kristalle zeigen zwei intermolekulare Kontakte: eine Interaktion zwischen Helix 6 über Leu 153 und der hydrophoben Tasche an der Innenseite des Flügels sowie eine weitere Interaktion zwischen zwei bzw. vier PII-Domänen (Bitto und McKay, 2002). Möglicherweise sind intermolekulare Kontakte neben der Bindung von Helix 6 in der Spalte auch Substrat-vermittelt und somit in der Kristallstruktur noch nicht beobachtet worden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Bindung von Helix 6 auch nur artifiziell im Kristall stattfindet und in löslichen Proteinen nicht vorkommt.

5.2.2 Aktivität generierter SurA-Cys-Proteine

Durch die Cys-Mutagenese wurden Aminosäuren gegen Cys ausgetauscht. Es wurde daher untersucht, ob durch Austausch dieser Aminosäuren gegen Cys die Chaperon-artige Aktivität gemindert oder sogar beseitigt wird. Aus bisherigen Ergebnissen zur Mutagenese von SurA (Diplomarbeit S. Flörl; Arbeiten S. Behrens) konnten keine entscheidenden Hinweise auf einzelne Aminosäuren, die zur Chaperon-artigen Aktivität beitragen, geliefert werden. So wurden verschiedene Reste im Flügel und der Spalte sowie in Helix 6, die für die intermolekularen Kontakte verantwortlich ist, ausgetauscht. In der Spalte bzw. auf der Innenseite des Flügels wurden bis zu sechs hydrophobe Aminosäuren gegen Ser bzw. Ala ausgetauscht, ohne einen im σ^E -*assay* (Mecbas *et al.*, 1993; Rouvière und Gross, 1996) detektierbaren Funktionsverlust. Einzig der Austausch von R147 gegen Alanin führte zu einer leicht erhöhten σ^E -Aktivität und somit zu einer verringerten Chaperon-artigen Aktivität, was den Schluss nahe legt, dass R147 eine gewisse Funktionsrelevanz besitzt.

Die SurA-Proteine Q78C, Q106C, Q223C und N227C wurden mittels Citrat-Synthase *assay* auf Chaperon-artige Aktivität untersucht (Buchner *et al.*, 1998). Die Unterdrückung der thermalen Aggregation von Citrat-Synthase wird dabei als ein indirekter Nachweis der SurA-Aktivität betrachtet. Als Kontrolle wurde BSA in den fluoreszenzspektroskopischen Messungen eingesetzt, welches zu einem gewissen Maß die thermale Aggregation der Citrat-Synthase unterdrückt. Alle SurA-Cys-Proteine sowie Wildtyp-SurA führten jedoch zur stärkeren Unterdrückung des Aggregationsprozesses. Dabei lagen die MTSSL-markierten SurA-Cys-Proteine relativ nah dem Unterdrückungsniveau des unmarkierten Wildtypes, sodaß hier auf eine unverminderte Chaperon-artige Aktivität geschlossen werden kann. Der Austausch von Q78, Q106, Q223 und N227 gegen Cystein und die Markierung mit MTSSL (außer für Q223C) führt somit nicht zu einem detektierbaren Verlust der Chaperon-artigen Funktion von SurA.

Die Aktivitäts-Messungen des MTSSL-markierten SurAN227C wurden bei einem zweifach molaren Überschuss an Peptid 71 und 46 durchgeführt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Peptide alleine schon eine relativ starke Aggregations-unterdrückende Wirkung, etwa mit der von BSA vergleichbar, zeigten. SurA unterdrückt die Aggregation der Citrat-Synthase; in Anwesenheit von Peptid 46, für das eine spezifische Bindung an SurA gezeigt wurde, wird SurA gebunden und steht somit nicht mehr für die Unterdrückung der Aggregation zur Verfügung. Solch inhibiertes SurA würde somit eine ungehinderte „normale“ thermale Aggregation zulassen. Es wurde allerdings eine Unterdrückung der thermalen Aggregation von SurAN227C in Gegenwart von Peptid 46 beobachtet. Zum einen wäre dieses dadurch zu erklären, dass Peptid 46 eine andere Bindestelle (multiple Substratbindestellen, siehe 5.1.3) in SurA als die Citrat-Synthase besetzt. Zum anderen könnte es sein, dass Peptid 46 von der Citrat-Synthase gebunden wurde und somit nicht durch SurA. Somit würde SurA ungehemmt die Aggregation der Citrat-Synthase unterdrücken. Doch diese Möglichkeit ist höchst unwahrscheinlich, da die Bindung von SurA an Peptid 46 sehr affin ($K_D \sim 3 \mu\text{M}$) und zudem spezifisch ist und die Affinität der Citrat-Synthase zu dem Peptid 46 unter dieser K_D von $\sim 3 \mu\text{M}$ liegen müsste. Folglich ist unklar, wie es zu dieser Beobachtung der starken Aggregationshemmung durch SurA in Gegenwart von Peptid 46 kommt. Dennoch konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass die Variante SurAN227C aktiv ist, da sie in Anwesenheit des nur schwach und unspezifisch mit SurA interagierenden Peptides 71 die Aggregation der Citrat-Synthase erwartungsgemäß unterdrückt.

5.2.3 Ortspezifische Radikalsonden zur Interaktionsanalyse zwischen SurA und Peptiden

Zur Kartierung der Oberfläche von SurA im Bereich der Spalte und am Eingang zum Tunnel wurde die Radikalsonde MTSSL an Cys-Reste gekoppelt (Wegener *et al.*, 2001; Kweon *et al.*, 2003). Dazu wurden die auf der IMAC-Säule immobilisierten SurA-Cys-Proteine (Q78C, Q106C, Q223C und N227C) mit 5 mM DTT-Puffer reduziert, gewaschen und mit 1 mM MTSSL bei pH 6,7 inkubiert (modifiziert nach Kweon *et al.*, 2003). Dieses Verfahren hat sich in der Praxis als die effektivste Markierungs-Methode herausgestellt, da sonst nach der IMAC-Reinigung noch ein zusätzlicher Markierungsschritt vorgenommen werden müsste. Die markierten Proteine wurden anschließend mittels Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt, um Dimere sowie Imidazol aus der IMAC-Reinigung zu entfernen.

Die so modifizierten SurA-Proteine mit Konzentrationen von 50 bis 150 μM wurden zunächst zur Überprüfung der MTSSL-Kopplung mit *continuous wave* (cw) EPR-Spektroskopie (X-Band) analysiert. Im Falle von gekoppeltem MTSSL sollte die Immobilisierung der Radikalsonde als verbreitertes Spektrum mit vergrößerten *peak to peak* Abständen zu verzeichnen sein (Hoppe *et al.*, 1982; Atkins, 1990). Als Vergleich wurde das EPR-Spektrum einer nicht immobilisierten

Radikalsonde, die ein charakteristisches Triplett-Spektrum des freien Elektrons des Stickstoffes (Ikryannikova *et al.*, 2004) aufweist, herangezogen.

Es konnte für alle SurA-Cys-Proteine, bis auf Q223C, ein EPR-Signal verzeichnet werden. Da für Q223C auch in zwei weiteren Versuchen kein Signal erhalten wurde, liegt der Rest Q223C für MTSSL vermutlich unzugänglich vor. Vermutlich und entsprechend der Kristallstruktur von SurA liegt der Cystein-Rest in Position 223 verdeckt am Boden der Spalte. Alle anderen Radikalsonden zeigten sehr genau die aufgrund der SurA-Struktur zu erwartenden Mobilitäten und geben dadurch Aufschluss über die Umgebung. Die Sonden an den Resten Q78C und N227C waren am stärksten immobilisiert. Hier waren die Amplituden der Seiten-*peaks* sowohl nach Außen verschoben als auch deutlich in der Höhe verringert, was als Zeichen für eingeschränkte Mobilität gilt (Pfeiffer *et al.*, 1999). Anders bei Q106C. Hier ließen die Spektren zwar auf eine gegenüber freiem MTSSL verminderte, gegenüber Q78C und N227C aber deutlich erhöhte Mobilität der Radikalsonde schließen. Aus den so gewonnen Informationen über Ort und Mobilität der Radikalsonde kann abgeleitet werden, das die Position Q106C bezüglich Sensitivität und Zugänglichkeit am besten zur Kartierung der entsprechenden Bereiche geeignet sind. Aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen konnten bisher jedoch keine deutlichen Signale gemessen werden. Das geringe Signal-zu-Rausch Verhältnis lässt bei geringen Abweichungen zwischen zwei Spektren mit und ohne Peptid kaum Aussagen über veränderte Mobilität zu (Hammarström *et al.*, 2001).

Generell wird die Mobilität des Nitroxides der Radikalsonde durch drei verschiedene strukturelle Faktoren beeinflusst: (i) Restriktion der Mobilität des Nitroxides durch Einflüsse des Peptid-Rückrates des Proteins, das in allen hier untersuchten Fällen eine α -helikale Sekundärstruktur aufweist. (ii) Interaktionen mit tertiären Strukturen von anderen Teilen des Proteins würde die Bewegung des Nitroxides einschränken. (iii) weitere Einflüsse, wie Kontakte mit anderen Molekülen und Änderungen der Viskosität der Umgebung verlangsamen die Mobilität der Nitroxides-Radikals (McHaourab *et al.*, 1996; Hubbell *et al.*, 1998; Columbus und Hubbell, 2002; Kweon *et al.*, 2003). Bei Interaktion von MTSSL-markierten SurA-Cys-Proteinen mit Peptiden in räumlicher Nähe zur Radikalsonde können somit Änderungen der Mobilität durch alle drei beschriebenen Faktoren verursacht werden. Es ist nicht auszuschließen, dass aufgrund der Bindung des Peptides das Peptid-Rückrat, an dem die Sonde kovalent *via* Cys verankert ist, eine strukturelle Änderung vollzieht. Ebenfalls könnte die Mobilität durch intramolekulare Kontakte eingeschränkt werden. Denkbar wäre im Falle der im Flügel von SurA lokalisierten Sonden (Positionen 78, 106 und 227) ein direkter Kontakt mit der gegenüberliegenden Seiten des Proteins oder mit der Helix 6. Im Falle einer Bindung durch Peptide in direkter Umgebung der Sonde wäre die gewünschte Immobilisierung des Nitroxides zu verzeichnen.

Die markierten SurA-Cys-Proteine Q78C, Q106C und N227C wurden mit einem zweifach

molaren Überschuss der Peptide 46 und 71 für 2 h bei pH 6,7 bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dadurch, selbst bei einer möglichen 1:2 Bindungsstöchiometrie, eine Sättigung der Bindestellen gewährleistet. Wie bereits erwähnt, ergaben die resultierenden EPR-Spektren ein geringes Signal-zu-Rausch Verhältnis. Aufgrund dieses Befundes waren keine konkreten Aussagen zu möglichen, durch die Peptide verursachten Änderungen der Spektren, zu machen. Möglicherweise haben die Peptide aber auch nicht im unmittelbaren Einflussbereich der Sonde gebunden und konformationelle Änderungen waren möglicherweise zu geringfügig, um detektiert zu werden. Für die Varianten SurAQ78C und SurAN227C ist außerdem zu berücksichtigen, dass die Mobilität der Sonde vermutlich zu eingeschränkt war, um eine weitere, direkt durch Peptide induzierte Reduktion ihrer Mobilität zu detektieren.

Die in dieser Arbeit erzielten bisherigen Resultate zur ortsspezifischen Radikalsonde MTSSL an SurA-Cys-Proteinen zeigen, dass grundsätzlich eine Markierung mit MTSSL und Detektion eines EPR-Signals möglich ist. Allerdings sind zu geringe Protein-Konzentrationen, die ein vermindertes Signal-zu-Rausch Verhältnis verursachen, ein Problem bei der Auswertung und dem Vergleich zweier Spektren. Es können daher nur drastische Unterschiede der Sonden-Mobilität registriert werden. Dahingehend erfordern zukünftige Experimente Protein-Konzentrationen von mindestens 150 μM . Dennoch ist die EPR-Spektroskopie mit *site-directed spin labeling* gegenüber anderen Methoden am vielversprechendsten, um Aufschluß über den Ort der Substratbindung zu geben. Die Reste H68 und Q191 sind nach den bisherigen Erkenntnissen aus der virtuellen MTSSL-Markierung die geeignetsten Positionen, um die Mulde zu kartieren (siehe 4.2.1)

5.3 Zur Rolle von SurA in der Porinreifung

In Abwesenheit von SurA und Skp weisen *E.coli*-Zellen einen synthetisch letalen Phänotyp auf, was vermuten lässt, dass beide Proteine in dem gleichen oder in einem parallelen Prozeß der Porinreifung beteiligt sind (Behrens *et al.*, 2001; Rizzitello *et al.*, 2001). Letzteres Modell wird durch genetische Evidenzen unterstützt. Für SurA wurde die Beteiligung an frühen Schritten des Reifungsprozesses von LamB, der Konversion von ungefalteten Monomeren zu sogenannten f-Monomeren gezeigt (Rouvière und Gross, 1996). Dieses ist einem nativen, gefalteten Monomer sehr ähnlich. Ebenso interagiert Skp in einem frühen Schritt des Faltungsprozesses mit OMP-Faltungsintermediaten an der periplasmatischen Seite der inneren Membran (Schäfer *et al.*, 1999; Harms *et al.*, 2001). Biochemische Untersuchungen zur Lokalisation von SurA haben kürzlich ergeben, dass SurA mit der äußeren, nicht aber mit der inneren Membran assoziiert ist (Hennecke *et al.*, 2005). Es ist somit zu vermuten, dass SurA in einem frühen Schritt der Porinreifung im Periplasma und einem späten Membran-assoziierten Schritt mitwirkt. Jedoch findet der frühe Schritt nicht an der inneren Membran statt, womit Skp also in der Abfolge noch vor SurA einzuordnen wäre. In diesem Zusammenhang ist die beschriebene Assoziation von

monomeren Porin-Intermediaten an der äußeren Membran interessant (Sen und Nikaido, 1990; Misra *et al.*, 1991). Daraus lässt sich ein Modell zum Ablauf der Biogenese der Poren-bildenden Proteine erstellen: nach dem Durchqueren der inneren Membran wird das, vermutlich mit teilweise ausgebildeten Sekundärstrukturen vorliegende, Porin-Faltungsintermediat durch SurA erkannt und gebunden. Dieser Komplex assoziiert mit der äußeren Membran, wobei es noch unklar ist, ob zu diesem Zeitpunkt schon ein nativ-gefaltetes Monomer vorliegt. Die Interaktion mit der äußeren Membran kann entweder Substrat- oder SurA-vermittelt sein. Bisherige Erkenntnisse aus *in vitro* Experimenten zur Kinetik des Insertions- und Trimerisierungsprozesses lassen vermuten, dass die OMPs ausgehend von Membran-assoziierten Faltungsintermediaten in die Lipiddoppelschicht inserieren. Das β -barrel wird dabei allerdings erst in der Membran geschlossen (Kleinschmidt und Tamm, 1996). Es ist aber weiterhin unklar, ob die Porin-Monomere vor oder nach Insertion in die äußere Membran trimerisieren. Nach vorliegenden Befunden findet die Trimerisierung in oder an der Membran statt (Surrey *et al.*, 1996; Arora *et al.*, 2001). Andere Experimente zeigen aber auch, dass die Trimerisierung durch Formierung einer zentralen Pore an den Kontaktstellen der Porin-Untereinheiten bereits im Periplasma initiiert wird (Schulz, 1993).

In diesen vorgeschlagenen Prozessen zur Faltung könnte es Aufgabe von SurA sein, die Porine in einem Zustand, der eine Insertion und Trimerisierung erlaubt, zu halten. Die aus dieser Arbeit erhaltenen Resultate zur Lokalisation von SurA-Bindestellen an den Kontaktflächen der Trimer-Untereinheiten festigen diese Hypothese. Es wurde mittels Durchmusterung von Peptid-Bibliotheken und Lokalisation SurA-bindender Bereiche in den nativen Strukturen der OMPs gezeigt, dass SurA einzelne Bereiche der Trimer-Interaktionsflächen besetzt und somit möglicherweise ihre frühzeitige Trimerisierung verzögert bzw. verhindert. Membranexponierte Regionen hingegen wurden nur spärlich oder gar nicht von SurA gebunden. Um die Trimerisierung der OMPs vor ihrer Insertion in die äußere Membran zu ermöglichen, müssten die gebundenen SurA-Moleküle vorher abgestreift werden, damit die Trimer-Kontaktflächen zugänglich sind. Doch wie wird die für diesen Abstreifungsprozess notwendige Energie bereitgestellt? Möglicherweise könnte die Trimerisierung selbst die benötigte Energie bereitstellen. In diesem Falle wäre auch die Trimerisierung der OMPs bereits im Periplasma möglich. Dieses widerspricht jedoch dem Befund, dass monomere OMP-Faltungsintermediate assoziiert mit der äußeren Membran nachgewiesen wurden (Misra *et al.*, 1991; Harms *et al.*, 2001). Eine weitere, plausible Erklärung wäre, dass durch die Insertion in die Membran ein Abstreifen des Chaperons ermöglicht wird. Die SurA-Bindestellen sind mehrheitlich an den Kontaktflächen der Trimer-Untereinheiten zu finden, wodurch möglicherweise ein frühzeitiges Trimerisieren verhindert wird. Hingegen sind Bereiche, die mit der Membran interagieren, nur wenig durch SurA geschützt, so dass eine Insertion in die äußere Membran möglich wäre.

Durch diesen Insertionsprozeß, der möglicherweise spontan verläuft (Misra *et al.*, 1991), könnte die Energie zum Abstreifen von SurA geliefert werden. Die dann von SurA befreiten Monomere könnten trimerisieren und somit ein natives Trimer bilden. Dieses Modell lässt aber dennoch zwei mögliche Zeitpunkte zur Trimerisierung offen: die Untereinheiten könnten entweder während oder erst nach der Insertion in die äußere Membran trimerisieren.

Ferner könnte die Bindung von SurA an *loop 3* die korrekte Orientierung des LamB- oder OmpF Porins gewährleisten. Dabei würde *loop 3* zusätzlich in die zentrale Pore ausgerichtet und somit vor unerwünschter Interaktion mit der Membran oder den Strängen des β -barrels, sofern diese schon ausgebildet sind, geschützt werden. Die thermodynamisch getriebene Insertion in die Membran würde anschaulich erklären, wie SurA von seinem Substrat freigesetzt werden kann, in einem Kompartiment, das keine bekannten Energieträger aufweist.

6 Zusammenfassung

Das periplasmatische, als Peptidyl-Prolyl Isomerase (PPIase) und Chaperon charakterisierte Protein SurA aus *Escherichia coli* ist an der Reifung von Porinen der äußeren Membran beteiligt. Das Protein ist aus drei Regionen aufgebaut: der N-terminalen Region, zwei aufeinanderfolgenden Parvulin-ähnlichen PPIase-Domänen (PI und PII) und einer kurzen C-terminalen Sequenz. Die PPIase-Aktivität ist in der PII-Domäne, die Chaperon-artige Aktivität in den N- und C-terminalen Regionen lokalisiert. Der *surA*-Phänotyp zeichnet sich durch eine destabilisierte äußere Membran aus, verursacht durch einen verringerten Gehalt an *outer membrane proteins*. Im Gegensatz zu anderen molekularen Chaperonen bindet SurA Substrate selektiv, so z.B. *in vitro* synthetisierte Porine der äußeren Membran. Zu dem molekularen Mechanismus dieser selektiven Substraterkennung ist jedoch wenig bekannt. In dieser Arbeit sollte die molekulare Basis der Interaktion zwischen SurA und seinen natürlichen Substraten nachgegangen werden. Dazu wurden zum einen Peptid-Bibliotheken natürlicher Substrate nach SurA-bindenden Peptiden durchmustert und bindende Abschnitte auf die native Struktur der Substrate übertragen, zum anderen Experimente zur Lokalisation von Substrat-bindenden Bereichen auf der Oberfläche von SurA durchgeführt.

Zellulose-gebundene Peptide-Bibliotheken von LamB, OmpF und OmpA wurden mit Wildtyp-SurA bzw. mit SurAN+ICt, einer SurA-Variante, der die aktive PPIase-Domäne PII fehlt, auf Bindung durchmustert. Mittels *surface plasmon resonance* (SPR) und Fluoreszenzspektroskopie wurde bestätigt, dass ein als SurA-Binder identifiziertes Peptid (Peptid 46 der LamB-Bibliothek) mit signifikant höherer Affinität an SurA bindet als ein als Nicht-Binder identifiziertes Peptid (Peptid 71 der LamB-Bibliothek). Die Affinität des Peptides 46 für SurA wurde mit einer K_D von 3–9 μM bestimmt und die Spezifität dieser Bindung durch fluoreszenzspektroskopische Kompetitionsstudien verifiziert.

Als charakteristische Merkmale SurA-bindender Peptide wurden (i) spezifische Muster aromatischer Aminosäuren – Ar-x-Ar und Ar-Ar (mit Ar = F, W, Y oder H und x = beliebige Aminosäure) mit einer weiteren, flankierenden aromatischen Aminosäure im Abstand von maximal sieben Aminosäuren – sowie (ii) die Ausrichtung ihrer aromatischen Seitenketten – zwei Seitenketten auf der gleichen und idealerweise eine weitere Seitenkette auf der gleichen oder gegenüberliegenden Seite des Peptides – identifiziert. Das gemeinsame Auftreten beider Merkmale ist charakteristisch für integrale Proteine der äußeren Membran und kann daher als entscheidendes Kriterium der selektiven Substraterkennung und -bindung durch SurA gewertet werden.

Die Lokalisierung identifizierter, SurA-bindender Peptide in den nativen Strukturen der Proteine LamB und OmpF zeigte, dass zahlreiche putative Bindestellen in den Kontaktflächen der

Trimer-Untereinheiten, jedoch nur wenige in den Membran-exponierten Bereichen der Trimer liegen. Im Einklang mit bisherigen Erkenntnissen zur Reifung und Membraninsertion der Proteine der äußeren Membran konnte auf Basis einer derartigen Besetzung der Porin-Faltungsintermediate durch SurA erstmals ein mechanistisch und energetisch schlüssiges Arbeitsmodell zur Rolle von SurA in diesen Prozessen aufgestellt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Identifizierung einer Substratbindestelle in SurA mittels *electron paramagnetic resonance* unter Verwendung zuvor identifizierter SurA-bindender Peptide. Durch ortsspezifische Mutagenese wurden Cysteine in verschiedenen, exponierten Positionen des SurA-Moleküls eingebracht und über Thiolkopplung kovalent mit der Radikalsonde MTSSL verknüpft. Auf diese Weise konnten MTSSL-Sonden in drei Positionen innerhalb der Spalte von SurA immobilisiert werden. Die Chaperon-artige Aktivität des SurA-Proteins blieb durch die Cys-Substitutionen und die MTSSL-Sonde in diesen Positionen unbeeinflusst. Der aus den EPR-Spektren hervorgehende Immobilisierungsgrad der Sonden war im Einklang mit der bekannten SurA-Kristallstruktur. Jedoch war in Anwesenheit löslicher, SurA-bindender Peptide keine verminderte Mobilität der Sonden erkennbar, so dass bisher keine Hinweise auf den Ort der Substratbindung in SurA gewonnen werden konnten.

7 Literaturverzeichnis

Agterberg, M., Adriaanse, H., Tijhaar, E., Resink, A. und Tommassen, J. (1989). **Role of the cell surface-exposed regions of outer membrane protein PhoE of Escherichia coli K12 in the biogenesis of the protein.** *Eur J Biochem* 185 (2), 365-70.

Alba, B. M., Leeds, J. A., Onufryk, C., Lu, C. Z. und Gross, C. A. (2002). **DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response.** *Genes Dev* 16 (16), 2156-68.

Alba, B. M., Zhong, H. J., Pelayo, J. C. und Gross, C. A. (2001). **degS (hhoB) is an essential Escherichia coli gene whose indispensable function is to provide sigma (E) activity.** *Mol Microbiol* 40 (6), 1323-33.

Andersen, C., *et al.* (1999). **In vivo and in vitro studies of major surface loop deletion mutants of the Escherichia coli K-12 maltoporin: contribution to maltose and maltooligosaccharide transport and binding.** *Mol Microbiol* 32 (4), 851-67.

Andersen, C. L., Matthey-Dupraz, A., Missiakas, D. und Raina, S. (1997). **A new Escherichia coli gene, dsbG, encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation, required for recycling DsbA/DsbB and DsbC redox proteins.** *Mol Microbiol* 26 (1), 121-32.

Anfinsen, C. B. (1972). **The formation and stabilization of protein structure.** *Biochem J* 128 (4), 737-49.

Anfinsen, C. B. (1973). **Principles that govern the folding of protein chains.** *Science* 181 (96), 223-30.

Arie, J. P., Sassoon, N. und Betton, J. M. (2001). **Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of Escherichia coli.** *Mol Microbiol* 39 (1), 199-210.

Arora, A., Abildgaard, F., Bushweller, J. H. und Tamm, L. K. (2001). **Structure of outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy.** *Nat Struct Biol* 8 (4), 334-8.

Arora, A., Rinehart, D., Szabo, G. und Tamm, L. K. (2000). **Refolded outer membrane protein A of Escherichia coli forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers.** *J Biol Chem* 275 (3), 1594-600.

Atkins, P. W., **Physikalische Chemie.** 2. Auflage. 1990, VCH Verlagsgesellschaft mbH (Weinheim).

Bader, M., Muse, W., Zander, T. und Bardwell, J. (1998). **Reconstitution of a protein disulfide catalytic system.** *J Biol Chem* 273 (17), 10302-7.

Baranova, N. und Nikaido, H. (2002). **The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in Escherichia coli and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate.** *J Bacteriol* 184 (15), 4168-76.

Bardwell, J. C., McGovern, K. und Beckwith, J. (1991). **Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo.** *Cell* 67 (3), 581-9.

- Bauer, K., van der Ley, P., Benz, R. und Tommassen, J. (1988). **The pho-controlled outer membrane porin PhoE does not contain specific binding sites for phosphate or polyphosphates.** *J Biol Chem* 263 (26), 13046-53.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. und Seemuller, E. (1998). **The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease.** *Cell* 92 (3), 367-80.
- Beece, D., *et al.* (1980). **Solvent viscosity and protein dynamics.** *Biochemistry* 19 (23), 5147-57.
- Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F. X. und Gross, C. A. (2001). **The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity.** *Embo J* 20 (1-2), 285-94.
- Benz, R. und Bauer, K. (1988). **Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins.** *Eur J Biochem* 176 (1), 1-19.
- Berliner, L. J., Grunwald, J., Hankovszky, H. O. und Hideg, K. (1982). **A novel reversible thiol-specific spin label: papain active site labeling and inhibition.** *Anal Biochem* 119 (2), 450-5.
- Bernstein, H. D. (2000). **The biogenesis and assembly of bacterial membrane proteins.** *Curr Opin Microbiol* 3 (2), 203-9.
- Bitto, E. und McKay, D. B. (2002). **Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins.** *Structure (Camb)* 10 (11), 1489-98.
- Bitto, E. und McKay, D. B. (2003). **The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins.** *J Biol Chem* 278 (49), 49316-22.
- Bitto, E. und McKay, D. B. (2004). **Binding of phage-display-selected peptides to the periplasmic chaperone protein SurA mimics binding of unfolded outer membrane proteins.** *FEBS Lett* 568 (1-3), 94-8.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. (1987). **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyamide gels.** *Electrophoresis* 8 93-99.
- Bothmann, H. und Pluckthun, A. (2000). **The periplasmic Escherichia coli peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragments with and without cis-prolines.** *J Biol Chem* 275 (22), 17100-5.
- Brandon, C. und Tooze, J., **Introduction to Protein Structure.** Second Edition. 1999, Garland Publishing, Inc. (New York).
- Brinkman, F. S., Bains, M. und Hancock, R. E. (2000). **The amino terminus of Pseudomonas aeruginosa outer membrane protein OprF forms channels in lipid bilayer membranes: correlation with a three-dimensional model.** *J Bacteriol* 182 (18), 5251-5.
- Buchanan, S. K. (1999). **Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding.** *Curr Opin Struct Biol* 9 (4), 455-61.
- Buchner, J., Grallert, H. und Jakob, U. (1998). **Analysis of chaperone function using citrate**

synthase as nonnative substrate protein. *Methods Enzymol* 290 323-38.

Bukau, B. und Horwich, A. L. (1998). **The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines.** *Cell* 92 (3), 351-66.

Bulieris, P. V., Behrens, S., Holst, O. und Kleinschmidt, J. H. (2003). **Folding and insertion of the outer membrane protein OmpA is assisted by the chaperone Skp and by lipopolysaccharide.** *J Biol Chem* 278 (11), 9092-9.

Cantor, C. und Schimmel, P., **Techniques for the study of biological structure and function.** Biophysical Chemistry. Vol. II. 1980, W.H. Freeman and Company (New York).

Chan, W. C., Schirmer, T. und Ferenci, T. (1996). **Combinatorial mutagenesis analysis of residues in the channel constriction loop L3 and neighbouring beta-strands in the LamB glycoporin of Escherichia coli.** *Mol Membr Biol* 13 (1), 41-48.

Charbit, A., *et al.* (2000). **In vivo and in vitro studies of transmembrane beta-strand deletion, insertion or substitution mutants of the Escherichia coli K-12 maltoporin.** *Mol Microbiol* 35 (4), 777-90.

Chen, J., *et al.* (1999). **Chaperone activity of DsbC.** *J Biol Chem* 274 (28), 19601-5.

Chen, R. und Henning, U. (1996). **A periplasmic protein (Skp) of Escherichia coli selectively binds a class of outer membrane proteins.** *Mol Microbiol* 19 (6), 1287-94.

Cheung, M. S., Garcia, A. E. und Onuchic, J. N. (2002). **Protein folding mediated by solvation: water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2), 685-90.

Chou, P. Y. und Fasman, G. D. (1974). **Prediction of protein conformation.** *Biochemistry* 13 (2), 222-45.

Christensen, L. L. (1997). **Theoretical analysis of protein concentration determination using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation.** *Anal Biochem* 249 (2), 153-64.

Columbus, L. und Hubbell, W. L. (2002). **A new spin on protein dynamics.** *Trends Biochem Sci* 27 (6), 288-95.

Conlan, S., Zhang, Y., Cheley, S. und Bayley, H. (2000). **Biochemical and biophysical characterization of OmpG: A monomeric porin.** *Biochemistry* 39 (39), 11845-54.

Connolly, L., De Las Penas, A., Alba, B. M. und Gross, C. A. (1997). **The response to extracytoplasmic stress in Escherichia coli is controlled by partially overlapping pathways.** *Genes Dev* 11 (15), 2012-21.

Cowan, S. W., *et al.* (1992). **Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins.** *Nature* 358 (6389), 727-33.

Danese, P. N., *et al.* (1998). **Accumulation of the enterobacterial common antigen lipid II biosynthetic intermediate stimulates degP transcription in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 180 (22), 5875-84.

Dartigalongue, C. und Raina, S. (1998). **A new heat-shock gene, ppiD, encodes a peptidyl-**

prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in Escherichia coli.

Embo J 17 (14), 3968-80.

De Cock, H., *et al.* (1999). **Affinity of the periplasmic chaperone Skp of Escherichia coli for phospholipids, lipopolysaccharides and non-native outer membrane proteins. Role of Skp in the biogenesis of outer membrane protein.** *Eur J Biochem* 259 (1-2), 96-103.

De Las Penas, A., Connolly, L. und Gross, C. A. (1997a). **SigmaE is an essential sigma factor in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 179 (21), 6862-4.

De Las Penas, A., Connolly, L. und Gross, C. A. (1997b). **The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in Escherichia coli is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE.** *Mol Microbiol* 24 (2), 373-85.

Dekker, N., Merck, K., Tommassen, J. und Verheij, H. M. (1995). **In vitro folding of Escherichia coli outer-membrane phospholipase A.** *Eur J Biochem* 232 (1), 214-9.

Dill, K. A., *et al.* (1995). **Principles of protein folding-a perspective from simple exact models.** *Protein Sci* 4 (4), 561-602.

Doyle, D. A., *et al.* (1996). **Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ.** *Cell* 85 (7), 1067-76.

Duan, Y. und Kollman, P. A. (1998). **Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution.** *Science* 282 (5389), 740-4.

Dumas, F., Koebnik, R., Winterhalter, M. und Van Gelder, P. (2000). **Sugar transport through maltoporin of Escherichia coli. Role of polar tracks.** *J Biol Chem* 275 (26), 19747-51.

Dutzler, R., Wang, Y. F., Rizkallah, P., Rosenbusch, J. P. und Schirmer, T. (1996). **Crystal structures of various maltooligosaccharides bound to maltoporin reveal a specific sugar translocation pathway.** *Structure* 4 (2), 127-34.

Eaton, W. A., Thompson, P. A., Chan, C. K., Hage, S. J. und Hofrichter, J. (1996). **Fast events in protein folding.** *Structure* 4 (10), 1133-9.

Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (1996). **Protein-protein interactions: PDZ domain networks.** *Curr Biol* 6 (11), 1385-8.

Fischer, G., Bang, H. und Mech, C. (1984). **[Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides].** *Biomed Biochim Acta* 43 (10), 1101-11.

Fivash, M., Towler, E. M. und Fisher, R. J. (1998). **BIAcore for macromolecular interaction.** *Curr Opin Biotechnol* 9 (1), 97-101.

Frank, R. (2002). **The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications.** *J Immunol Methods* 267 (1), 13-26.

Freedman, R. B. (1989). **Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins.** *Cell* 57 (7), 1069-72.

Freifelder, D., **Physical Biochemistry.** Second Edition. 1982, W.H. Freeman and Company

(New York).

Gething, M. J. und Sambrook, J. (1992). **Protein folding in the cell.** *Nature* 355 (6355), 33-45.

Goldstein, B., Coombs, D., He, X., Pineda, A. R. und Wofsy, C. (1999). **The influence of transport on the kinetics of binding to surface receptors: application to cells and BIAcore.** *J Mol Recognit* 12 (5), 293-9.

Grinsted, J. und Bennett, P. M. (1988). **Methods in microbiology: plasmid technology, 21.** *Academic Press, San Diego*

Hagen, S. J. (2003). **Exponential decay kinetics in "downhill" protein folding.** *Proteins* 50 (1), 1-4.

Hammarström, P., Owenius, R., Martensson, L. G., Carlsson, U. und Lindgren, M. (2001). **High-resolution probing of local conformational changes in proteins by the use of multiple labeling: unfolding and self-assembly of human carbonic anhydrase II monitored by spin, fluorescent, and chemical reactivity probes.** *Biophys J* 80 (6), 2867-85.

Hani, J., Stumpf, G. und Domdey, H. (1995). **PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases.** *FEBS Lett* 365 (2-3), 198-202.

Harms, N., *et al.* (2001). **The early interaction of the outer membrane protein phoe with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane.** *J Biol Chem* 276 (22), 18804-11.

Harrick, N. J., **Internal Reflection Spectroscopy.** 1967, Interscience-Wiley, New York.

Hartl, F. U. (1996). **Molecular chaperones in cellular protein folding.** *Nature* 381 (6583), 571-9.

Hartl, F. U. und Hayer-Hartl, M. (2002). **Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein.** *Science* 295 (5561), 1852-8.

Hayano, T., Takahashi, N., Kato, S., Maki, N. und Suzuki, M. (1991). **Two distinct forms of peptidylprolyl-cis-trans-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells.** *Biochemistry* 30 (12), 3041-8.

Hayhurst, A. und Harris, W. J. (1999). ***Escherichia coli* skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments.** *Protein Expr Purif* 15 (3), 336-43.

Hendrick, J. P. und Hartl, F. U. (1995). **The role of molecular chaperones in protein folding.** *Faseb J* 9 (15), 1559-69.

Hennecke, G., Nolte, J., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J. und Behrens, S. (2005). **The Periplasmic Chaperone SurA Exploits Two Features Characteristic of Integral Outer Membrane Proteins for Selective Substrate Recognition.** *J Biol Chem* 280 (25), 23540-8.

Hilt, W. und Wolf, D. H. (1996). **Proteasomes: destruction as a programme.** *Trends Biochem Sci* 21 (3), 96-102.

Hlodan, R. und Hartl, F., **How the protein folds in the cells.** New York: Oxford University

Press. 1994 194-228.

Hofmann, M. A. und Brian, D. A. (1991). **Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony.** *Biotechniques* 11 (1), 30-1.

Hofnung, M. (1995). **An intelligent channel (and more).** *Science* 267 (5197), 473-4.

Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H. und Ziegler, H., **Biophysik.** 2. Auflage. 1982, Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York).

Horne, S. M. und Young, K. D. (1995). **Escherichia coli and other species of the Enterobacteriaceae encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins.** *Arch Microbiol* 163 (5), 357-65.

Howard, B. R., Vajdos, F. F., Li, S., Sundquist, W. I. und Hill, C. P. (2003). **Structural insights into the catalytic mechanism of cyclophilin A.** *Nat Struct Biol* 10 (6), 475-81.

Hubbell, W. L., Gross, A., Langen, R. und Lietzow, M. A. (1998). **Recent advances in site-directed spin labeling of proteins.** *Curr Opin Struct Biol* 8 (5), 649-56.

Ikryannikova, L. N., Ustynyuk, L. A., Trubitsin, B. V., Koksharov, Y. A. und Tikhonov, A. N. (2004). **Isotropic hyperfine splitting in the nitroxide radicals 4-amino-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline-N-oxyl and 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl.** *Mendeleev Commun.* (5) 195-197.

Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990). **High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids.** *Gene* 96 (1), 23-8.

Jaenicke, R. (1998). **Protein self-organization in vitro and in vivo: partitioning between physical biochemistry and cell biology.** *Biol Chem* 379 (3), 237-43.

Johnsson, B., Lofas, S. und Lindquist, G. (1991). **Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors.** *Anal Biochem* 198 (2), 268-77.

Jones, C. H., Danese, P. N., Pinkner, J. S., Silhavy, T. J. und Hultgren, S. J. (1997). **The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems.** *Embo J* 16 (21), 6394-406.

Jones, D. T. (1999). **Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices.** *J Mol Biol* 292 (2), 195-202.

Jönsson, U., *et al.* (1991). **Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology.** *Biotechniques* 11 (5), 620-7.

Kågedal, L., *et al.* (1991). **Chemical, physical and chromatographic properties of Superdex 75 prep grade and Superdex 200 prep grade gel filtration media.** *J. of Chromatog.* 537 17-32.

Karlsson, R. und Fält, A. (1997). **Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors.** *J Immunol Methods* 200 (1-2), 121-33.

Kirby, T. L., Karim, C. B. und Thomas, D. D. (2004). **Electron paramagnetic resonance reveals a large-scale conformational change in the cytoplasmic domain of**

phospholamban upon binding to the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry* 43 (19), 5842-52.

Kleinschmidt, J. H., den Blaauwen, T., Driessen, A. J. und Tamm, L. K. (1999). **Outer membrane protein A of Escherichia coli inserts and folds into lipid bilayers by a concerted mechanism.** *Biochemistry* 38 (16), 5006-16.

Kleinschmidt, J. H. und Tamm, L. K. (1996). **Folding intermediates of a beta-barrel membrane protein. Kinetic evidence for a multi-step membrane insertion mechanism.** *Biochemistry* 35 (40), 12993-3000.

Kleinschmidt, J. H. und Tamm, L. K. (1999). **Time-resolved distance determination by tryptophan fluorescence quenching: probing intermediates in membrane protein folding.** *Biochemistry* 38 (16), 4996-5005.

Kluck, C. J., *et al.* (2002). **Structure-function analysis of HscC, the Escherichia coli member of a novel subfamily of specialized Hsp70 chaperones.** *J Biol Chem* 277 (43), 41060-9.

Koebnik, R. (1995). **Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins.** *Mol Microbiol* 16 (6), 1269-70.

Koebnik, R., Locher, K. P. und Van Gelder, P. (2000). **Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell.** *Mol Microbiol* 37 (2), 239-53.

Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. und Hughes, C. (2000). **Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export.** *Nature* 405 (6789), 914-9.

Kramer, A. und Schneider-Mergener, J. (1998). **Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports.** *Methods Mol Biol* 87 25-39.

Kramer, A., Volkmer-Engert, R., Malin, R., Reineke, U. und Schneider-Mergener, J. (1993). **Simultaneous synthesis of peptide libraries on single resin and continuous cellulose membrane supports: examples for the identification of protein, metal and DNA binding peptide mixtures.** *Pept Res* 6 (6), 314-9.

Kretschmann, E. und Raether, H. (1967). **Zur Theorie der Plasmaresonanzstrahlung an rauhen Oberflächen.** *Z Naturforsch [C]* 22a 1623-1625.

Kurad, D., Jeschke, G. und Marsh, D. (2003). **Lipid membrane polarity profiles by high-field EPR.** *Biophys J* 85 (2), 1025-33.

Kweon, D. H., Kim, C. S. und Shin, Y. K. (2003). **Insertion of the membrane-proximal region of the neuronal SNARE coiled coil into the membrane.** *J Biol Chem* 278 (14), 12367-73.

Laemmli, U. K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 227 (5259), 680-5.

Laird, M. W., Kloser, A. W. und Misra, R. (1994). **Assembly of LamB and OmpF in deep rough lipopolysaccharide mutants of Escherichia coli K-12.** *J Bacteriol* 176 (8), 2259-64.

Laufen, T., *et al.* (1999). **Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ**

cochaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (10), 5452-7.

Lazar, S. W., Almiron, M., Tormo, A. und Kolter, R. (1998). **Role of the Escherichia coli SurA protein in stationary-phase survival.** *J Bacteriol* 180 (21), 5704-11.

Lazar, S. W. und Kolter, R. (1996). **SurA assists the folding of Escherichia coli outer membrane proteins.** *J Bacteriol* 178 (6), 1770-3.

Liebecq, C. (1997). **IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) and Nomenclature Committee of IUBMB (NC-IUBMB). Newsletter 1996.** *Eur J Biochem* 247 (2), 733-9.

Liu, J. und Walsh, C. T. (1990). **Peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from Escherichia coli: a periplasmic homolog of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (11), 4028-32.

Lou, K. L., et al. (1996). **Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. I. Crystallographic analysis.** *J Biol Chem* 271 (34), 20669-75.

Lu, K. P., Hanes, S. D. und Hunter, T. (1996). **A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis.** *Nature* 380 (6574), 544-7.

Manting, E. H., van Der Does, C., Remigy, H., Engel, A. und Driessen, A. J. (2000). **SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel.** *Embo J* 19 (5), 852-61.

McCarty, J. S., et al. (1996). **Regulatory region C of the E. coli heat shock transcription factor, sigma32, constitutes a DnaK binding site and is conserved among eubacteria.** *J Mol Biol* 256 (5), 829-37.

McGuffin, L. J., Bryson, K. und Jones, D. T. (2000). **The PSIPRED protein structure prediction server.** *Bioinformatics* 16 (4), 404-5.

McHaourab, H. S., Lietzow, M. A., Hideg, K. und Hubbell, W. L. (1996). **Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. Correlation with protein structure and dynamics.** *Biochemistry* 35 (24), 7692-704.

McMillan, D. R., Gething, M. J. und Sambrook, J. (1994). **The cellular response to unfolded proteins: intercompartmental signaling.** *Curr Opin Biotechnol* 5 (5), 540-5.

Mecas, J., Rouviere, P. E., Erickson, J. W., Donohue, T. J. und Gross, C. A. (1993). **The activity of sigma E, an Escherichia coli heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins.** *Genes Dev* 7 (12B), 2618-28.

Millhauser, G. L., Fiori, W. R. und Miick, S. M. (1995). **Electron spin labels.** *Methods Enzymol* 246 589-610.

Misra, R. (1993). **OmpF assembly mutants of Escherichia coli K-12: isolation, characterization, and suppressor analysis.** *J Bacteriol* 175 (16), 5049-56.

Misra, R., Peterson, A., Ferenci, T. und Silhavy, T. J. (1991). **A genetic approach for analyzing the pathway of LamB assembly into the outer membrane of Escherichia coli.** *J Biol Chem* 266 (21), 13592-7.

- Missiakas, D., Betton, J. M. und Raina, S. (1996). **New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of Escherichia coli SurA, FkpA and Skp/OmpH.** *Mol Microbiol* 21 (4), 871-84.
- Missiakas, D. und Raina, S. (1997). **Protein folding in the bacterial periplasm.** *J Bacteriol* 179 (8), 2465-71.
- Missiakas, D. und Raina, S. (1998). **The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation.** *Mol Microbiol* 28 (6), 1059-66.
- Mogk, A., Mayer, M. P. und Deuerling, E. (2002). **Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology.** *ChemBiochem* 3 (9), 807-14.
- Morona, R., Kramer, C. und Henning, U. (1985a). **Bacteriophage receptor area of outer membrane protein OmpA of Escherichia coli K-12.** *J Bacteriol* 164 (2), 539-43.
- Morona, R., Manning, P. A. und Reeves, P. (1983). **Identification and characterization of the TolC protein, an outer membrane protein from Escherichia coli.** *J Bacteriol* 153 (2), 693-9.
- Morona, R., Tommassen, J. und Henning, U. (1985b). **Demonstration of a bacteriophage receptor site on the Escherichia coli K12 outer-membrane protein OmpC by the use of a protease.** *Eur J Biochem* 150 (1), 161-9.
- Mortimer, E., **Chemie.** 2. Auflage. 1973, Georg Thieme Verlag (Stuttgart).
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.** *Methods Enzymol* 155 335-50.
- Myszka, D. G., He, X., Dembo, M., Morton, T. A. und Goldstein, B. (1998). **Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data.** *Biophys J* 75 (2), 583-94.
- Needleman, S. B. und Wunsch, C. D. (1970). **A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins.** *J Mol Biol* 48 (3), 443-53.
- Nelson, M. und McClelland, M. (1992). **Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes.** *Methodes Enzymology* 216 279-303.
- Netzer, W. J. und Hartl, F. U. (1998). **Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms.** *Trends Biochem Sci* 23 (2), 68-73.
- Nikaido, H. (1985). **Role of permeability barriers in resistance to beta-lactam antibiotics.** *Pharmacol Ther* 27 (2), 197-231.
- Nikaido, H. (1992). **Porins and specific channels of bacterial outer membranes.** *Mol Microbiol* 6 (4), 435-42.
- Nikaido, H. (1994). **Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes.** *J Biol Chem* 269 (6), 3905-8.
- Nikaido, H. (1996). **Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria.** *J Bacteriol* 178 (20), 5853-9.

- Nikaïdo, H. (2003). **Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.** *Microbiol Mol Biol Rev* 67 (4), 593-656.
- Nikaïdo, H. und Vaara, M. (1985). **Molecular basis of bacterial outer membrane permeability.** *Microbiol Rev* 49 (1), 1-32.
- Oh, K. J., *et al.* (1999). **Conformation of the diphtheria toxin T domain in membranes: a site-directed spin-labeling study of the TH8 helix and TL5 loop.** *Biochemistry* 38 (32), 10336-43.
- O'Keeffe, A. H., East, J. M. und Lee, A. G. (2000). **Selectivity in lipid binding to the bacterial outer membrane protein OmpF.** *Biophys J* 79 (4), 2066-74.
- Otto, K. und Silhavy, T. J. (2002). **Surface sensing and adhesion of Escherichia coli controlled by the Cpx-signaling pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (4), 2287-92.
- Owinius, R., *et al.* (1999). **Properties of spin and fluorescent labels at a receptor-ligand interface.** *Biophys J* 77 (4), 2237-50.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. und Gray, T. (1995). **How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.** *Protein Sci* 4 (11), 2411-23.
- Patzelt, H., *et al.* (2001). **Binding specificity of Escherichia coli trigger factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (25), 14244-9.
- Pautsch, A. und Schulz, G. E. (1998). **Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain.** *Nat Struct Biol* 5 (11), 1013-7.
- Pautsch, A. und Schulz, G. E. (2000). **High-resolution structure of the OmpA membrane domain.** *J Mol Biol* 298 (2), 273-82.
- Persson, M., *et al.* (1999). **EPR mapping of interactions between spin-labeled variants of human carbonic anhydrase II and GroEL: evidence for increased flexibility of the hydrophobic core by the interaction.** *Biochemistry* 38 (1), 432-41.
- Pfeiffer, M., Rink, T., Gerwert, K., Oesterhelt, D. und Steinhoff, H. J. (1999). **Site-directed spin-labeling reveals the orientation of the amino acid side-chains in the E-F loop of bacteriorhodopsin.** *J Mol Biol* 287 (1), 163-71.
- Phale, P. S., *et al.* (1998). **Stability of trimeric OmpF porin: the contributions of the latching loop L2.** *Biochemistry* 37 (45), 15663-70.
- Phale, P. S., *et al.* (2001). **Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation.** *Biochemistry* 40 (21), 6319-25.
- Raffa, R. G. und Raivio, T. L. (2002). **A third envelope stress signal transduction pathway in Escherichia coli.** *Mol Microbiol* 45 (6), 1599-611.
- Rahfeld, J. U., Schierhorn, A., Mann, K. und Fischer, G. (1994). **A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from Escherichia coli.** *FEBS Lett* 343 (1), 65-9.
- Ramm, K. und Pluckthun, A. (2000). **The periplasmic Escherichia coli peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity in vitro.** *J Biol Chem* 275 (22), 17106-13.

- Ramm, K. und Plückthun, A. (2001). **High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric E. coli peptidyl-prolyl-isomerase FkpA.** *J Mol Biol* 310 (2), 485-98.
- Ranquin, A. und Van Gelder, P. (2004). **Maltoporin: sugar for physics and biology.** *Res Microbiol* 155 (8), 611-6.
- Ranson, N. A., White, H. E. und Saibil, H. R. (1998). **Chaperonins.** *Biochem J* 333 (Pt 2) 233-42.
- Reimer, U., Reineke, U. und Schneider-Mergener, J. (2002). **Peptide arrays: from macro to micro.** *Curr Opin Biotechnol* 13 (4), 315-20.
- Rich, R. L. und Myszka, D. G. (2002). **Survey of the year 2001 commercial optical biosensor literature.** *J Mol Recognit* 15 (6), 352-76.
- Rietsch, A. und Beckwith, J. (1998). **The genetics of disulfide bond metabolism.** *Annu Rev Genet* 32 163-84.
- Rietsch, A., Belin, D., Martin, N. und Beckwith, J. (1996). **An in vivo pathway for disulfide bond isomerization in Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (23), 13048-53.
- Rizzitello, A. E., Harper, J. R. und Silhavy, T. J. (2001). **Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of Escherichia coli.** *J Bacteriol* 183 (23), 6794-800.
- Robertson, K. M. und Tieleman, D. P. (2002). **Molecular basis of voltage gating of OmpF porin.** *Biochem Cell Biol* 80 (5), 517-23.
- Robson, B. und Pain, R. H. (1976). **The mechanism of folding of globular proteins. Equilibria and kinetics of conformational transitions of penicillinase from Staphylococcus aureus involving a state of intermediate conformation.** *Biochem J* 155 (2), 331-44.
- Roseman, A. M., Chen, S., White, H., Braig, K. und Saibil, H. R. (1996). **The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL.** *Cell* 87 (2), 241-51.
- Rouvière, P. E. und Gross, C. A. (1996). **SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins.** *Genes Dev* 10 (24), 3170-82.
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J. und Bukau, B. (1997). **Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries.** *Embo J* 16 (7), 1501-7.
- Rüdiger, S., Schneider-Mergener, J. und Bukau, B. (2001). **Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone.** *Embo J* 20 (5), 1042-50.
- Saiki, R. K., *et al.* (1988). **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* 239 (4839), 487-91.
- Saint, N., *et al.* (1996). **Structural and functional characterization of OmpF porin mutants**

selected for larger pore size. II. Functional characterization. *J Biol Chem* 271 (34), 20676-80.

Sauer, F. G., *et al.* (1999). **Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis.** *Science* 285 (5430), 1058-61.

Sauer, F. G., Knight, S. D., Waksman, G. J. und Hultgren, S. J. (2000). **PapD-like chaperones and pilus biogenesis.** *Semin Cell Dev Biol* 11 (1), 27-34.

Schäfer, U., Beck, K. und Müller, M. (1999). **Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins.** *J Biol Chem* 274 (35), 24567-74.

Schiene, C. und Fischer, G. (2000). **Enzymes that catalyse the restructuring of proteins.** *Curr Opin Struct Biol* 10 (1), 40-5.

Schirmer, T. (1998). **General and specific porins from bacterial outer membranes.** *J Struct Biol* 121 (2), 101-9.

Schirmer, T., Keller, T. A., Wang, Y. F. und Rosenbusch, J. P. (1995). **Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution.** *Science* 267 (5197), 512-4.

Scholz, C., Rahfeld, J., Fischer, G. und Schmid, F. X. (1997). **Catalysis of protein folding by parvulin.** *J Mol Biol* 273 (3), 752-62.

Schulein, K., Schmid, K. und Benzl, R. (1991). **The sugar-specific outer membrane channel ScrY contains functional characteristics of general diffusion pores and substrate-specific porins.** *Mol Microbiol* 5 (9), 2233-41.

Schulz, G. E. (1993). **Bacterial porins: structure and function.** *Curr Opin Cell Biol* 5 (4), 701-7.

Schulz, G. E. (2000). **beta-Barrel membrane proteins.** *Curr Opin Struct Biol* 10 (4), 443-7.

Sen, K. und Nikaïdo, H. (1990). **In vitro trimerization of OmpF porin secreted by spheroplasts of Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (2), 743-7.

Seshadri, K., Garemyr, R., Wallin, E., von Heijne, G. und Elofsson, A. (1998). **Architecture of beta-barrel membrane proteins: analysis of trimeric porins.** *Protein Sci* 7 (9), 2026-32.

Sjölander, S. und Urbaniczky, C. (1991). **Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis.** *Anal Chem* 63 (20), 2338-45.

Skerra, A. (1994). **Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in Escherichia coli.** *Gene* 151 (1-2), 131-5.

Snyder, W. B., Davis, L. J., Danese, P. N., Cosma, C. L. und Silhavy, T. J. (1995). **Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway.** *J Bacteriol* 177 (15), 4216-23.

Standaert, R. F., Galat, A., Verdine, G. L. und Schreiber, S. L. (1990). **Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP.** *Nature* 346 (6285), 671-4.

Steinhoff, H. J. (1988). **A simple method for determination of rotational correlation times**

and separation of rotational and polarity effects from EPR spectra of spin-labeled biomolecules in a wide correlation time range. *J Biochem Biophys Methods* 17 (4), 237-47.

Steinhoff, H. J. (2004). **Inter- and intra-molecular distances determined by EPR spectroscopy and site-directed spin labeling reveal protein-protein and protein-oligonucleotide interaction.** *Biol Chem* 385 (10), 913-20.

Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. und Urbaniczky, C. (1991). **Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins.** *Journal of Colloid and Interface Science* 143 (2), 513-526.

Stone, T. J., Buckman, T., Nordio, P. L. und McConnell, H. M. (1965). **Spin-labeled biomolecules.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 54 (4), 1010-7.

Surrey, T. und Jahnig, F. (1995). **Kinetics of folding and membrane insertion of a beta-barrel membrane protein.** *J Biol Chem* 270 (47), 28199-203.

Surrey, T., Schmid, A. und Jahnig, F. (1996). **Folding and membrane insertion of the trimeric beta-barrel protein OmpF.** *Biochemistry* 35 (7), 2283-8.

Svensson, M., *et al.* (1995). **Mapping the folding intermediate of human carbonic anhydrase II. Probing substructure by chemical reactivity and spin and fluorescence labeling of engineered cysteine residues.** *Biochemistry* 34 (27), 8606-20.

Tamm, L. K., Arora, A. und Kleinschmidt, J. H. (2001). **Structure and assembly of beta-barrel membrane proteins.** *J Biol Chem* 276 (35), 32399-402.

Teter, S. A. und Klionsky, D. J. (1999). **How to get a folded protein across a membrane.** *Trends Cell Biol* 9 (11), 428-31.

Todt, J. C. und McGroarty, E. J. (1992). **Acid pH decreases OmpF and OmpC channel size in vivo.** *Biochem Biophys Res Commun* 189 (3), 1498-502.

Tommassen, J., van der Ley, P., van Zeijl, M. und Agterberg, M. (1985). **Localization of functional domains in E. coli K-12 outer membrane porins.** *Embo J* 4 (6), 1583-7.

Tormo, A., Almiron, M. und Kolter, R. (1990). **surA, an Escherichia coli gene essential for survival in stationary phase.** *J Bacteriol* 172 (8), 4339-47.

Usher, K. C., Ozkan, E., Gardner, K. H. und Deisenhofer, J. (2001). **The plug domain of FepA, a TonB-dependent transport protein from Escherichia coli, binds its siderophore in the absence of the transmembrane barrel domain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (19), 10676-81.

Van Gelder, P., De Cock, H. und Tommassen, J. (1994). **Detergent-induced folding of the outer-membrane protein PhoE, a pore protein induced by phosphate limitation.** *Eur J Biochem* 226 (3), 783-7.

Van Gelder, P., *et al.* (2002). **Sugar transport through maltoporin of Escherichia coli: role of the greasy slide.** *J Bacteriol* 184 (11), 2994-9.

Van Gelder, P., Dutzler, R., Dumas, F., Koebnik, R. und Schirmer, T. (2001). **Sucrose transport through maltoporin mutants of Escherichia coli.** *Protein Eng* 14 (11), 943-8.

- Vandeputte-Rutten, L., *et al.* (2001). **Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from Escherichia coli suggests a novel catalytic site.** *Embo J* 20 (18), 5033-9.
- Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M. und Tommassen, J. (2003). **Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly.** *Science* 299 (5604), 262-5.
- Walsh, N. P., Alba, B. M., Bose, B., Gross, C. A. und Sauer, R. T. (2003). **OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain.** *Cell* 113 (1), 61-71.
- Walton, T. A. und Sousa, M. C. (2004). **Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation.** *Mol Cell* 15 (3), 367-74.
- Wang, W. und Malcolm, B. A. (1999). **Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis.** *Biotechniques* 26 (4), 680-2.
- Watanabe, M., Rosenbusch, J., Schirmer, T. und Karplus, M. (1997). **Computer simulations of the OmpF porin from the outer membrane of Escherichia coli.** *Biophys J* 72 (5), 2094-102.
- Webb, H. M., Ruddock, L. W., Marchant, R. J., Jonas, K. und Klappa, P. (2001). **Interaction of the periplasmic peptidylprolyl cis-trans isomerase SurA with model peptides. The N-terminal region of SurA is essential and sufficient for peptide binding.** *J Biol Chem* 276 (49), 45622-7.
- Wegener, A.-A. (2000). **Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Lichtrezeptors pSRII mit seinen Transducerprotein pHtrII.** *Dissertation.* Universität Dortmund.
- Wegener, A. A., Chizhov, I., Engelhard, M. und Steinhoff, H. J. (2000). **Time-resolved detection of transient movement of helix F in spin-labelled pharaonis sensory rhodopsin II.** *J Mol Biol* 301 (4), 881-91.
- Wegener, A. A., Klare, J. P., Engelhard, M. und Steinhoff, H. J. (2001). **Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis.** *Embo J* 20 (19), 5312-9.
- Werner, J., Augustus, A. M. und Misra, R. (2003). **Assembly of TolC, a structurally unique and multifunctional outer membrane protein of Escherichia coli K-12.** *J Bacteriol* 185 (22), 6540-7.
- Widmann, M. und Christen, P. (2000). **Comparison of folding rates of homologous prokaryotic and eukaryotic proteins.** *J Biol Chem* 275 (25), 18619-22.
- Wülfing, C. und Plückthun, A. (1994). **Protein folding in the periplasm of Escherichia coli.** *Mol Microbiol* 12 (5), 685-92.
- Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S. und Creighton, T. E. (1995). **Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in Escherichia coli.** *Biochemistry* 34 (15), 5075-89.
- Zavialov, A. V., *et al.* (2003). **Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from Yersinia pestis: preserved folding energy drives fiber formation.** *Cell* 113 (5), 587-96.

Zheng, W. D., Quan, H., Song, J. L., Yang, S. L. und Wang, C. C. (1997). **Does DsbA have chaperone-like activity?** *Arch Biochem Biophys* 337 (2), 326-31.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Die verwendeten ein- und dreibuchstabigen Abkürzungen für Aminosäuren, sowie alle verwendeten physikalischen Größen entsprechen der Konvention der *International Union for Biochemistry* (Liebecq, 1997).

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserum-Albumin
C-Terminus	Carboxy-terminaler Teil
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Didesoxynukleosidphosphat
DTT	Dithiotreitol
dYT	double yeast trptone
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECF	enhanced chemifluorescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	electron paramagnetic resonance
K_D	Dissoziations-Gleichgewichts Konstante
M_r	relatives Molekulargewicht
NHS	N-Hydroxysuccinimid
N-Terminus	Amino-terminaler Teil
ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
P/O	Promotor/Operator
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SPR	surface plasmon resonance
TBS	Tris buffered saline
U	Units
ü.N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

8.2 Sequenzen & Zusatzmaterial

Proteinsequenzen der Porine LamB, OmpF und OmpA (Orange: Signalsequenz des jeweiligen Proteins):

>EG10528 lamB Phage lambda receptor protein; maltose high-affinity uptake system
Length=446

MMITLRKLPLAVAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEEQQCFQTTGAQS
KYRLGNECETYAELKLGQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDPAFREA
NVQGKNLIEWLPGSTIWAGKRFYQRHVDVHMIDFYWWDISGPGAGLENIDVGFGLS
LAATRSSEAGSSSFASNNIYDYTNETANDVFDVRLAQMEINPGGTLELGVDYGRAN
LRDNYRLVDGASKDGWLFTEHTQSVLKGFNKFVYQYATDSMTSQGKGLSQGSGV
AFDNEKFAYNINNGHMLRILDHGAISMGDNDMMYVGMQDINWDNDNGTK
WWTVGIRPMYKWTPI MSTVMEIGYDNVESQRTGDKNNQYKITLAQQWQAGDSIWS
RPAIRVFATYAKWDEKWGYDYTGADNANFGKAVPADFNNGSFGRGDSDEWTF
GAQMEIWW

>EG10671 ompF Outer membrane protein 1a (Ia;b;F) Length=362

MMKRNILAVIVPALLVAGTANA AEIYNKDGKVDLYGKAVGLHYFSKNGENSYG
GNGDMTYARLGFKGETQINSDLTGYGQWEYNFQGNNSGADAQTGNKTRLA FAG
LKYADVGSFDYGRNYGVVYDALGYTDMLPEFGGDTAYSDDFFVGRVGGVATYRNS
NFFGLVDGLNFAVQYLKNERDTARRSNGDGVGGSISYEYEGFGIVGAYGAADRT
NLQEAQPLGNGKKA EQWATGLKYDANNIYLAANYGETRNATPITNKFTNTSGFAN
KTQDVLLVAQYQFDFGLRPSIAYTKSKAKDVEGIGDVDLVNYFEVGATYYFNKNMS
TYVDYIINQIDSDNKLGVGSDDTVAVGIVYQF

>EG10669 ompA Outer membrane protein 3a (II*;G;d) structural gene Length=346

MKKT AIAIAVALAGFATVAQAAPKDNTWYTGAKLGWSQYHDTGFINNNGPTHEN
QLGAGAFGGYQVNPYVGFEMGYDWLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYPI
TDDLDIYTRLGGMVWRADTKSNVYGKNHDTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQW
TNNIGDAHTIGTRPDNGMLSLGVSYRFGQGEAAPVVAPAPAPEVQTKHF TLKSD
VLFNFKATLKPEGQAALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIGSDAYNQGLSER
RAQSVVDYLISKGIPADKISARGMGESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEV
KGIKDVVTQPQA

Proteinsequenz von SurA:

MKNWKTLLLGIAMIAN--TSFAA-----PQVVDKVAAVVNGVLESVDVGLMQSVKLN
 LNAARQQLPDDATLRHQIMERLIMDQIILQMGQKMGVKISDEQLDQAI
 ANIAKQNNMTLDQMRSRLAYDGLNYNTYRNQIRKEMISEVRNNEVRRRITILPQEVESLAQVGNQNDASTE
 LNLSHILIPLENPTSDQVNEAESQAR
 AIVDQARNGADFGKLAIAHSADQQALNNGGQMGWGRIQELPGIFAQALSTAKKGDIVGPIRSVGFHILKVN
 DLRGESKNISVTEVHARHILLKPSPIMTDEQARVKLEQIAADIKSGKTTFAAAAKEFSQDPGSANQGGDLGWATP
 DIFDPAFRDALTRLNKGQMSAPVHSSFGWHLIELLDTRNVDKTDAAQKDRAYRMLMNRKFFSEEAASW
 MQEQRASAYVKILSN

Multipler Sequenzvergleich von SurA-Proteinen aus verschiedenen Organismen (CLUSTAL W (1.82)):

Proteinnummern NCBI:

E.coli: NP_414595

Salmonella: NP_459097

Yersinia: NP_404137

Vibrio: NP_230099

Buchnera: NP_239972

Xylella: NP_780018

Haemophilus: NP_438619

Pasteurella: NP_246145

<i>E.coli</i>	MKNWKTLLLGIAMIAN--TSFAA-----PQVVDKVAAVVNGVLESVDVGLMQSVKLN
<i>Salmonella</i>	MKNWKTLLLGIAMIAN--TSFAA-----PQVVDKVAAVVNGVLESVDVGLMQSVKLN
<i>Yersinia</i>	MKNWRTLILGLVICAN--TAFAA-----PQEVDKVAAVVDNGVVLQSDIDGLLQSVKMN
<i>vibrio</i>	MKLWKPTLISVLSALTLFNAHAE-----PKQLDSVAVIVNSGVILQSDVDSALKTIKAN
<i>Buchnera</i>	MKICIFIFFYIFSSIF--YVLAK-----NNQVDNITAIVNDEIILNSDVNEILVFLKKS
<i>Xylella</i>	MTRYFSIVLSLLLAVSCVFLPVASARQQQHQPFLDRIVAVVDNVLKSELDRAIHNVKSQ
<i>Haemophilus</i>	MKMKKFVLRSEFLLATLGCVAFTS----MAQAAERVVATVDGIPVLESQVRANMGKKGD-
<i>Pasteurella</i>	-MMKMINVKSIFWAILGLFIYVS----TAQAAERVVATVNGVPVLESQVKKNMGKKGQ-
	. . . : : ... *: . : *:*: : :

<i>E.coli</i>	AAQARQQLPDDATLRHQIMERLIMDQIILQMGQKMGVKISDEQLDQAIANIAKQNNMTLD
<i>Salmonella</i>	AGQAGQQLPDDATLRHQILERLIMDQIILQMGQKMGVKITDEQLDQAIANIAKQNNMTMD
<i>Yersinia</i>	AQQSGQVVPDDSTLRHQILERLIMDNIQLQMAKKMGITITDQALDKAIADIAAQNRTLA
<i>vibrio</i>	AKQNKQPLPQETVLRQVLEKLIIDTLQQQEADRIGVKIDDNRLNEAIKEIAKNNQQTQE
<i>Buchnera</i>	KKKFIIPKSD-FLKEKVLKLVDSLILQEAANSKNINITKEQIDTVIKNIALKKHISVD
<i>Xylella</i>	YVGHEGQLPPDEVLQRQVLERLILIKLQVARAQTNGIRVSDDELNQAISSIAENNKTSVD
<i>Haemophilus</i>	-----RQSAIDKIIDDILVQKAVQESGVKIDPREIDHIVEDTAARNGLTYG
<i>Pasteurella</i>	-----YQVALDKVIDDILVQQAIQNSGKVNVAQVDQIEGIAAQNGLTYG
	. : : : * : . . : : : * : : :

<i>E.coli</i>	QMRSLAYDGLN----YNTYRNQIRKEMISEVRNNEVRRRITILPQEVESLAQVGNQND
<i>Salmonella</i>	QMRSLAYDGLN----YSTYRNQIRKEMISEVRNNEVRRRITVLPQEVDAKQIGTQN
<i>Yersinia</i>	QMRSLAADGLS----YDTRQIRKEMLTSEVRNNEVRRRITILPQEVESLAKQMGNQV
<i>vibrio</i>	QLIASVAQEGLT----YPEFRQVRKEMAASDARNALVRRRINILPAEVDTLAELLAQET
<i>Buchnera</i>	HFKKQILLRNKPNPSYYDNFIKKIEILLKMKTIQDYELHKRINISEQEVNTIFKKLIKDN
<i>Xylella</i>	GLRQKLVAEGIS----FPEFRQSVRDEITVHHLRQGFQAQSRIVVSEGEVDTALAQANS-
<i>Haemophilus</i>	QFLDALDYQGIS----LNTFRQQIANQVMVGAVRNKAIQESIDVTREEVVALGQ-----
<i>Pasteurella</i>	QLLDALDYQGIS----YNAYRQQIANQILMGEIRNQAIGQSIDVTRQVEALS-----
	: : . . : : : : * : * : :

```

E.coli          DASTELNLSHILIPLENPTSQVNEAESQARAIVDQARNG-ADFGKLAIAHSADQQALN
Salmonella     DASTELNLSHILIALPENPTSEQVNDQRQAESIVEEARNG-ADFGKLAITYSADQQALK
Yersinia       SGGTELNLSHILIPLENPTQQQVQDAEDLANKLVADIKGG-ADFGKLAIANSDSQALK
vibrio         DATVQYKISHIQLRVDDG---QDKSTAETLANKLVNDLRNG-ADFAQMAYAYSKGPKALQ
Buchnera       EKFKKINLSYILLPSLKQSDNAVRNRTKIAENIVYKLLKGG-YDFEKLLIECEKNKSTFI
Xylella        ---AQYHLQHILVSLPDGATSEQIAIAQKKINGIKSVIDKGELAFSAAAVRYSDSPNALE
Haemophilus    -----
Pasteurella    -----

E.coli          GGQMGWGRIQELPGIFAQALSTAKKGDIVGPIRSGVGFHILKVNDLRGESKNIS----VT
Salmonella     GGQMGWGRIQELPGIFAQALSTAKKGDIVGPIRSGVGFHILKVNDLRGQSQSIS----VT
Yersinia       GGQMGWGKIQELPSLFAERLQSAHKEIVGPIRSGVGFHILKVNDMRGADQTIS----VT
vibrio         GGDWGWMRKEEMPTIFADQIKMQNKGSIIGPFRSGVGFHILKIDDVKG-LETVA----VT
Buchnera       VKKMFWKPLLDIQNSFFKTLNIFKKGQILGPIVGDKGLYILKVNDIHKKENI----VT
Xylella        SDDLGWRSLEIPEAFQMVQTMKPGQIVGPLRGTSGFQLLKLVEVRDSTAAAGPRQMAT
Haemophilus    -----KMLDEAKSQGTAQKVT----GK
Pasteurella    -----QLLNQAKQAGTEKKIS----AP
                : * . .

E.coli          EVHARHILLKPSPIMTDEQARVKLEQIAADIKSGKTTFAAAAKEFSQDPGSANQGGDLGW
Salmonella     EVHARHILLKPSPIMNDQQARLKLLEEIAADIKSGKTTFAAAAKEYSQDPGSANQGGDLGW
Yersinia       EVNARHILLKPSPMMTDEQARAKLEAAAAEIKSGKTSFATIAKEISQDPGSAMQGGELGW
vibrio         EVNARHILIKPTIILSDEGAQKQLNEFVQRIKNGEVTFAELAQQYSQDPGSAAQKQELGY
Buchnera       E FYMQHCLIKPSVILTNTEAKKKIFNIYENIKKGIYTFDDAVKNSDDYYSNKKGDLGW
Xylella        EYHARHILVRITDKQKEAQAKAKIDTLRARIAGG-ADFQTVARESSEDANNSNQGDLGW
Haemophilus    EYEVRHILLKLNPLLNDAQAKQLAKIRSDI IAGKTTFADAALKYSKDYLSGANGGSLGY
Pasteurella    QYEVRHILLKLNPLLNDAQAKAQLTQIRADI IAGKMSFADAALHYSKDYLSGANGGSLGF
                : * * : . . : * : : * * * . . * . * : * . * :

E.coli          ATPDIFDPAFRDALTRLNKQMSAPVHSSFGWHLIELLDTRNVDKTDAAQKDRAYRMLMN
Salmonella     ATPDIFDPAFRDALTKLHKQGISAPVHSSFGWHLIELLDTRKVDKTDAAQKDRAYRMLMN
Yersinia       ASPDIYDPAFRDALMMLKKGKGEISAPVHSSFGWHLIQLVDTRQVDKTDAAQKERAYRMLFN
vibrio         QTPDLVYVPEFKHQIETLPGVQI SEPFKTVHGWHIVEVLDREVDRTDSALKNKAYRILFN
Buchnera       ISKESLGFDLNKKFLILDKNEISEPVKSNWGWHI FKILDRRQVDAFYKLLKNQAFNIVLN
Xylella        FPSDAFGADFGNHVKALADGNVSEPFRSAAGWHIVQRLGTRQTDVTTRENQRAQIRDITIGQ
Haemophilus    AFPEYAPQFAQT VVKSQGVISAPFKTEFGWHILEVTGVRDGDLTAEAYTQKAYERLVN
Pasteurella    AFPEAYVGAFAQKAILTTKKGVI SAPFKTEFGWHILEVTNTREGDKTIDVYRQKAYEQLVN
                : : . . . : * * : : * * : : * * * : . * . * : : :

E.coli          RKFSEEAASWMQEQRASAYVKILSN-----
Salmonella     RKFSEEAATWMQEQRASAYVKILSN-----
Yersinia       RKFEEEAQTMQEQRAAAAYVKILDGNSAQPQ-----
vibrio         RKFNEEASAWLQELRASAFVEVLKDEKDEQ-----
Buchnera       QKIISEKNHWIEDLKNTAYIEIIRS-----
Xylella        RKLEESYERFLRELRESEAYVSLQIEEPADDHHTPSAAVTPATGAVLPAATKH
Haemophilus    TQLQDATNDWVKALRKRANI QYFNK-----
Pasteurella    QQVKDVEKDWWKALRKNAEIRYLK-----
                : . . : : : * :

* = alle Reste sind identisch
: = konservierte Substitutionen beobachtet
. = semi-konservierte Substitutionen beobachtet

```

Biacore-Skript zur Automatisierung der Messabläufe, hier zur Re-Immobilisierung über Thiol-Kopplung:

```
! This method was generated from a command queue.
! Timestamp:      03-Feb-04 11:28
! Software:       BIACORE 2000 Control Software
! Version:        3.1.1
! Configuration:  IFC3 with Recovery
! ----

DEFINE APROG ReThiol

    CAPTION THIOL RE-Immobilization

    FLOW 5
    * INJECT R2A1 15 !DTT removal Ligand

RPOINT -b before_removal
* INJECT R2A2 10 !Reactivation with NHS/EDC
RPOINT -b after_removal

* INJECT R2A3 15 !PDEA Reactivation

RPOINT -b before_PDEA

* INJECT R2A4 10 !Ligand injection
RPOINT -b before_Ligand

* INJECT R2A5 15 !Deactivation with Cysteine

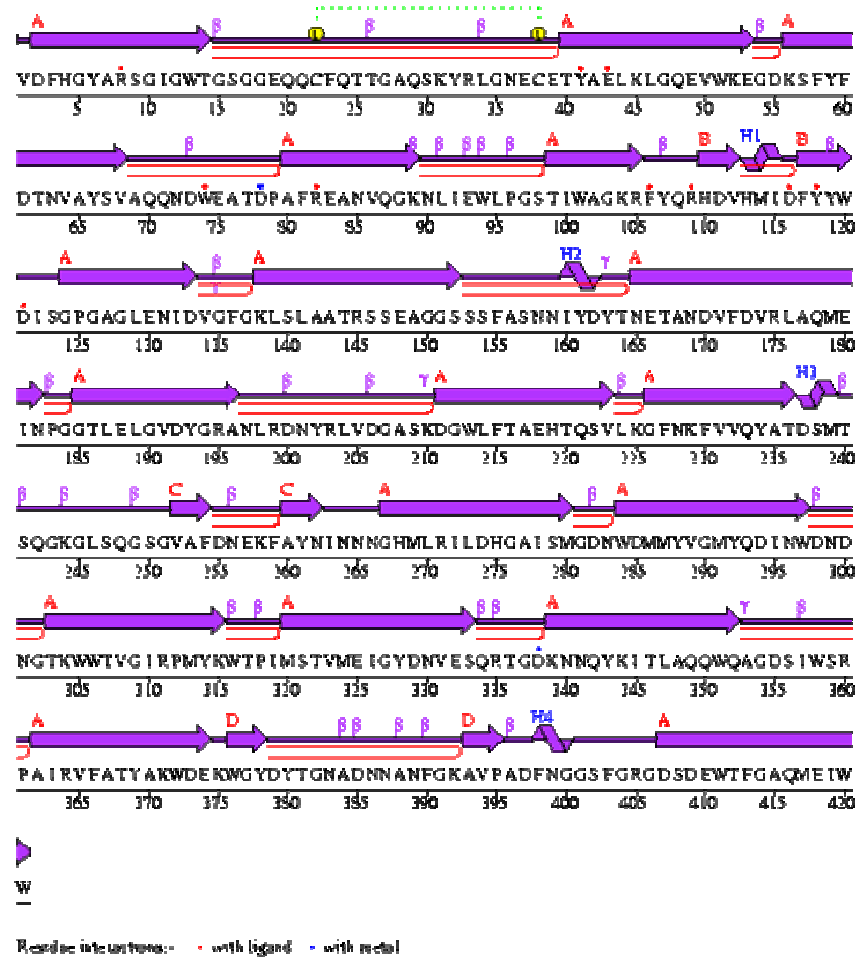
RPOINT -b immobilization_level
10:00 RPOINT netto_Binding

END
MAIN

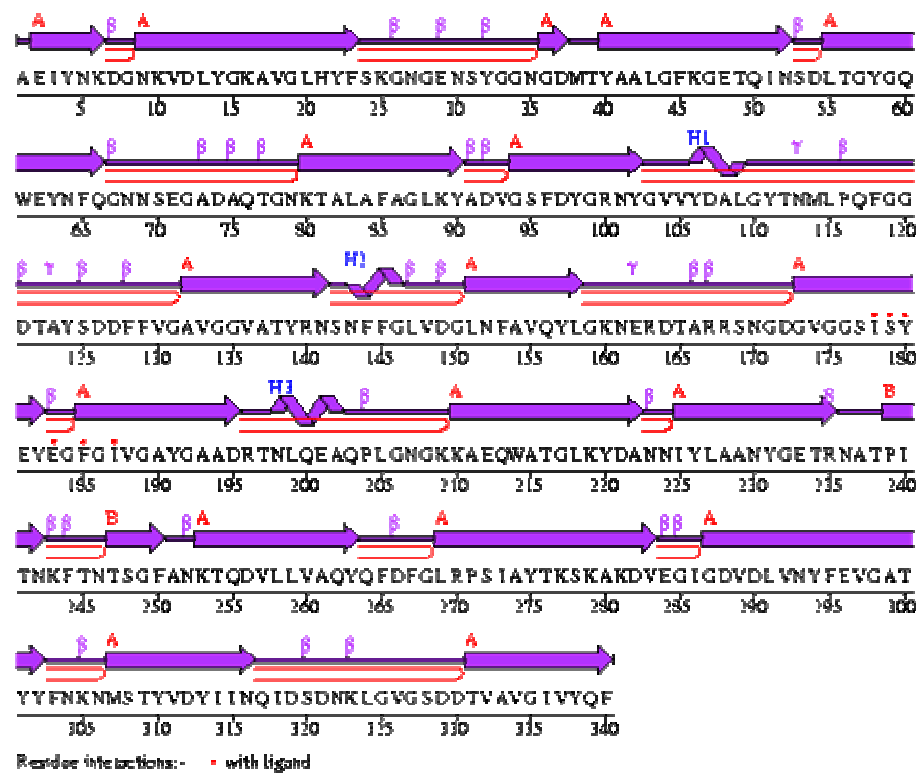
    RACK 2 Thermo_A
    APROG ReThiol

END
```

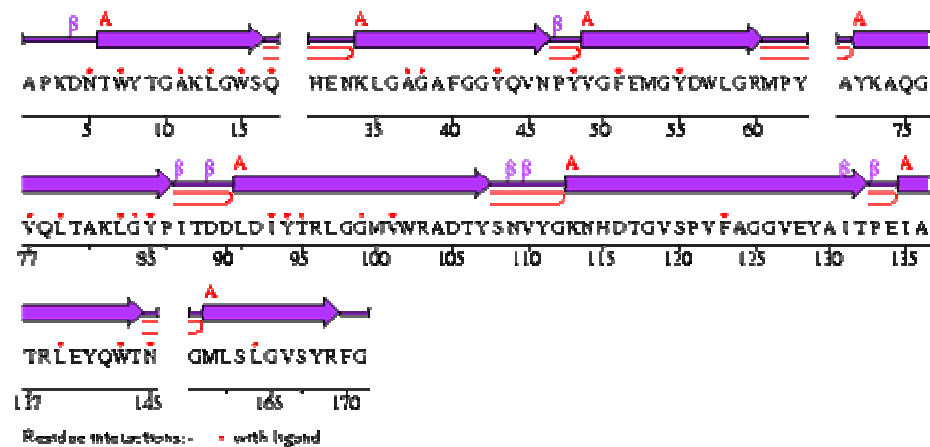

Sekundärstrukturen der nativen Porine LamB, OmpF und OmpA (Quelle: <http://www.rcsb.org/pdb/>):



Sekundärstruktur LamB



Sekundärstruktur OmpF



Sekundärstruktur der Transmembran-Domäne von OmpA

Peptide der Lamb-Bibliothek nach relativen Affinitäten zu Wildtyp-SurA sortiert, mit vorhergesagter Sekundärstruktur (PSIPRED V 2.3) und farbiger Markierung der Klassen (Klasse I grün, Klasse II gelb, Klasse III orange):

Laufindex	rel. Affinität	Pepitd #	Peptidsequenz	vorherg. Sekundärstruktur
1	100	131	F A T Y A K W D E K W G Y	CCCCCCCCCCCC
2	92,07	48	F Y Y W D I S G P G A G L	CEEECCCCCCCC
3	91,35	47	M I D F Y Y W D I S G P G	CEEEEECCCCCCCC
4	84,95	62	N I Y D Y T N E T A N D V	CCCCCCCCCCCC
5	84,73	10	F H G Y A R S G I G W T G	CCCCCCCCCCCC
6	78,83	46	D V H M I D F Y Y W D I S	CCCEEEEEEECCC
7	77,40	76	N Y R L V D G A S K D G W	CCCECCCCCCCC
8	70,24	28	S F Y F D T N V A Y S V A	CEEECCCCEECCC
9	70,17	132	Y A K W D E K W G Y D Y T	CCCCCCCCCCCC
10	69,47	39	N L I E W L P G S T I W A	CCCCCCCCCCCC
11	68,87	130	I R V F A T Y A K W D E K	CEEEEECCCCCCCC
12	66,34	111	W T V G I R F M Y K W T P	CCCCCCCCCCCC
13	65,74	44	R F Y Q R H D V H M I D F	CCCCCCCCEECCC
14	65,04	95	K F A Y N I N N N G H M L	CEEEEECCCCCCCC
15	65,00	133	W D E K W G Y D Y T G N A	CCCCCCCCCCCC
16	62,82	45	Q R H D V H M I D F Y Y W	CCCEEEEEEECCC
17	60,43	128	I W S R P A I R V F A T Y	CCCCCEEEEEEECCC
18	58,56	97	N N N G H M L R I L D H G	CCCCEEEEEECCC
19	57,98	42	T I W A G K R F Y Q R H D	CCCCHHHHCCCC
20	57,86	110	T K W W T V G I R P M Y K	CCEEEECCCCCCCC
21	56,91	30	N V A Y S V A Q Q N D W E	CCCECCCCCCCC
22	56,71	126	W Q A G D S I W S R P A I	CCCCCCCCCCCC
23	52,25	134	K W G Y D Y T G N A D N N	CCCCCCCCCCCC
24	51,49	27	G D K S F Y F D T N V A Y	CCCEEECCCCCCCC
25	50,39	112	G I R P M Y K W T P I M S	CCCCCEEECCCC
26	48,89	85	N K F V V Q Y A T D S M T	CCEEEEEECCCC
27	48,41	96	Y N I N N N G H M L R I L	CCCCCCCCEEEECCC
28	47,48	80	W L F T A E H T Q S V L K	CCCHHHHHHHHC
29	43,59	108	W D N D N G T K W W T V G	CCCCCCCCEEEECCC
30	40,06	109	D N G T K W W T V G I R P	CCCCEEEEEECCC
31	39,38	43	A G K R F Y Q R H D V H M	CCCCCHHHCCCC
32	39,30	127	G D S I W S R P A I R V F	CCCCCCCCCCCC
33	37,14	138	N A N F G K A V P A D F N	CCCCCCCCCCCC
34	37,11	125	A Q Q W Q A G D S I W S R	CCCCCCCCCCCC
35	36,26	83	S V L K G F N K F V V Q Y	CHHHHHHHHHCCC
36	35,35	13	G W T G S G G E Q Q C F Q	CCCCCCCCCCCC
37	35,15	41	P G S T I W A G K R F Y Q	CCCCCCCCCCCC
38	34,82	26	W K E G D K S F Y F D T N	CCCCCCCCEEEECCC
39	34,44	94	D N E K F A Y N I N N N G	CCCEEEEECCCC
40	30,62	113	P M Y K W T P I M S T V M	CCCCCHHHHHCCC
41	29,97	21	N E C E T Y A E L K L G Q	CCCHHHHHCCCC
42	29,66	146	D E W T F G A Q M E I W W	CCCCCCCCEEEECCC
43	29,09	68	A Q M E I N P G G T L E L	CCCCCCCCCCCC
44	28,69	73	D Y G R A N L R D N Y R L	CCCCCCCCCCCC
45	28,69	18	G A Q S K Y R L G N E C E	CCCCCCCCCCCC
46	27,91	79	K D G W L F T A E H T Q S	CCCEEECCCCCCCC
47	27,39	104	D M M Y V G M Y Q D I N W	CCEEEEEECCCC
48	27,28	129	R P A I R V F A T Y A K W	CCEEEEEECCCC
49	27,01	77	L V D G A S K D G W L F T	CCCCCCCCCCCC
50	26,43	33	N D W E A T D P A F R E A	CCCCCCCCCCCC
51	24,40	67	V R L A Q M E I N P G G T	CEEEEEEECCCC
52	24,29	142	N G G S F G R G D S D E W	CCCCCCCCCCCC
53	23,56	19	S K Y R L G N E C E T Y A	CCCCCCCCCCCC
54	23,28	66	V F D V R L A Q M E I N P	CCCEEEEEEECCC
55	21,33	107	D I N W D N D N G T K W W	CCCCCCCCCCCC
56	21,02	24	K L G Q E V W K E G D K S	CCCHHHHHCCCC
57	20,97	145	S D E W T F G A Q M E I W	CCCCCCCCCCCC
58	20,55	29	F D T N V A Y S V A Q Q N	CCCCEEEEEECCC
59	19,90	135	Y D Y T G N A D N N A N F	CCCCCCCCCCCC
60	19,84	84	K G F N K F V V Q Y A T D	CCCEEEEEEECCC
61	19,69	114	K W T P I M S T V M E I G	CCCHHHHHHHHC
62	19,47	72	L G V D Y G R A N L R D N	CCCCCCCCCCCC
63	18,92	92	G S G V A F D N E K F A Y	CCCCCCCCCCCC
64	18,88	8	Q A M A V D F H G Y A R S	CEEEEEEECCCC
65	18,87	52	L E N I D V G F G K L S L	CCCCCCCCCCCC
66	18,70	61	A S N N I Y D Y T N E T A	CCCEEECCCCCCCC
67	18,69	78	G A S K D G W L F T A E H	CCCCCCCCEEEECCC
68	17,94	122	K N N Q Y K I T L A Q Q W	CCCEEEEEEECCC
69	17,65	75	L R D N Y R L V D G A S K	CCCEEECCCCCCCC
70	17,12	64	N E T A N D V F D V R L A	CCCCCEEEEECCC
71	17,11	38	Q G K N L I E W L P G S T	CCCEEECCCCCCCC
72	16,48	141	A D F N G G S F G R G D S	CCCCCCCCCCCC

73	16,44	93	V	A	F	D	N	E	K	F	A	Y	N	I	N	CCCCCEEEEECC
74	16,36	74	R	A	N	L	R	D	N	Y	R	L	V	D	G	CCCCCCEEEEECC
75	16,18	49	W	D	I	S	G	P	G	A	G	L	E	N	I	CCCCCCCCCCCCC
76	15,89	55	K	L	S	L	A	A	T	R	S	S	E	A	G	CCCCCCCCCCCCC
77	15,30	98	G	H	M	L	R	I	L	D	H	G	A	I	S	CCEEEECCCCCCC
78	14,97	25	Q	E	V	W	K	E	G	D	K	S	F	Y	F	CHHHHCCCCCCCC
79	14,20	121	T	G	D	K	N	N	Q	Y	K	I	T	L	A	CCCCCCEEEEECC
80	14,11	9	A	V	D	F	H	G	Y	A	R	S	G	I	G	CCCCCCCCCCCCC
81	14,09	53	I	D	V	G	F	G	K	L	S	L	A	A	T	CCCCCCEEEEECC
82	14,03	34	E	A	T	D	P	A	F	R	E	A	N	V	Q	CCCCCHHCCCCC
83	13,26	65	A	N	D	V	F	D	V	R	L	A	Q	M	E	CCCCEEEEEECCC
84	13,10	137	A	D	N	N	A	N	F	G	K	A	V	P	A	CCCCCCCCCCCCC
85	12,92	82	H	T	Q	S	V	L	K	G	F	N	K	F	V	CHHHHHHHHHHCC
86	12,54	105	Y	V	G	M	Y	Q	D	I	N	W	D	N	D	CCCCCCCCCCCCC
87	12,29	116	S	T	V	M	E	I	G	Y	D	N	V	E	S	CCEEEECCCCCCC
88	11,78	14	G	S	G	G	E	Q	C	F	Q	T	T	G		CCCCHHHEECCCC
89	11,55	106	M	Y	Q	D	I	N	W	D	N	D	N	G	T	CCCCCCCCCCCCC
90	11,32	54	G	F	G	K	L	S	L	A	A	T	R	S	S	CCCCEEEEEECCC
91	11,20	37	A	N	V	Q	G	K	N	L	I	E	W	L	P	CCCCCCHHCCCC
92	11,17	57	T	R	S	S	E	A	G	G	S	S	S	F	A	CCCCCCCCCCCCC
93	11,16	22	E	T	Y	A	E	L	K	L	G	Q	E	V	W	CCCHHCCCCCCCC
94	10,99	101	G	A	I	S	M	G	D	N	W	D	M	M	Y	CCCCCCCCCCCCC
95	10,98	16	Q	C	F	Q	T	T	G	A	Q	S	K	Y	R	CCCCCCCCCCCCC
96	10,56	36	F	R	E	A	N	V	Q	G	K	N	L	I	E	CCCCCCCCCCCCC
97	10,54	103	D	N	W	D	M	M	Y	V	G	M	Y	Q	D	CCCCEEEEEECCC
98	10,21	69	E	I	N	P	G	G	T	L	E	L	G	V	D	CCCCCCEEEEECC
99	10,20	90	G	K	G	L	S	Q	G	S	G	V	A	F	D	CCCCCCCCCCCCC
100	9,96	56	L	A	A	T	R	S	S	E	A	G	G	S	S	CCCCCCCCCCCCC
101	9,93	87	Y	A	T	D	S	M	T	S	Q	G	K	G	L	CCCCCCCCCCCCC
102	9,93	115	P	I	M	S	T	V	M	E	I	G	Y	D	N	CHHHHHHHHHHCC
103	9,75	63	D	Y	T	N	E	T	A	N	D	V	F	D	V	CCCCCCCCCCCCC
104	8,88	23	A	E	L	K	L	G	Q	E	V	W	K	E	G	CCCCHHHHHHHCC
105	8,86	91	L	S	Q	G	S	G	V	A	F	D	N	E	K	CCCCCCCCCCCCC
106	8,83	11	Y	A	R	S	G	I	G	W	T	G	S	G	G	CCCCCCCCCCCCC
107	8,82	100	L	D	H	G	A	I	S	M	G	D	N	W	D	CCCCCCCCCCCCC
108	8,74	123	Q	Y	K	I	T	L	A	Q	Q	W	Q	A	G	CEEEEECCCCCCC
109	8,66	117	M	E	I	G	Y	D	N	V	E	S	Q	R	T	CCCCCCCCCCCCC
110	8,58	7	M	S	A	Q	A	M	A	V	D	F	H	G	Y	CCCCEEEEEECCC
111	8,56	15	G	E	Q	Q	C	F	Q	T	T	G	A	Q	S	CCCCHHHCCCCC
112	8,33	140	A	V	P	A	D	F	N	G	G	S	F	G	R	CCCCCCCCCCCCC
113	8,12	143	S	F	G	R	G	D	S	D	E	W	T	F	G	CCCCCCCCCCCCC
114	7,48	86	V	V	Q	Y	A	T	D	S	M	T	S	Q	G	CCEECCCCCCCCC
115	7,22	119	N	V	E	S	Q	R	T	G	D	K	N	N	Q	CCCCCCCCCCCCC
116	6,18	89	T	S	Q	G	K	G	L	S	Q	G	S	G	V	CCCCCCCCCCCCC
117	6,13	124	I	T	L	A	Q	Q	W	Q	A	G	D	S	I	CCCCCCCCCCCCC
118	6,12	59	G	G	S	S	F	A	S	N	N	I	Y	D		CCCCCCCCCCCCC
119	5,77	136	T	G	N	A	D	N	N	A	N	F	G	K	A	CCCCCCCCCCCCC
120	5,70	71	T	L	E	L	G	V	D	Y	G	R	A	N	L	CEEECCCCCCCCC
121	5,10	20	R	L	G	N	E	C	E	T	Y	A	E	L	K	CCCCHHHHHCCCC
122	5,03	58	S	E	A	G	G	S	S	S	F	A	S	N	N	CCCCCCCCCCCCC
123	4,41	102	S	M	G	D	N	W	D	M	M	Y	V	G	M	CCCCCEEEEECCC
124	4,18	12	S	G	I	G	W	T	G	S	G	G	E	Q	Q	CCCCCCCCCCCCC
125	3,57	120	S	Q	R	T	G	D	K	N	N	Q	Y	K	I	CCCCCCCCCCCCC
126	3,20	139	F	G	K	A	V	P	A	D	F	N	G	G	S	CCCCCCCCCCCCC
127	2,79	144	R	G	D	S	D	E	W	T	F	G	A	Q	M	CCCCCCCCCCCCC
128	1,94	6	A	G	V	M	S	A	Q	A	M	A	V	D	F	CCCCCCEEEEECC
129	0,96	1	M	M	I	T	L	R	K	L	P	L	A	V	A	CEEECCCCCCCCC
130	0,83	17	Q	T	T	G	A	Q	S	K	Y	R	L	G	N	CCCCCCCCCCCCC
131	0,81	81	T	A	E	H	T	Q	S	V	L	K	G	F	N	CHHHHHHHHHHCC
132	0,55	70	P	G	G	T	L	E	L	G	V	D	Y	G	R	CCCCEEEECCCCC
133	0,47	35	D	P	A	F	R	E	A	N	V	Q	G	K	N	CCCCCCCCCCCCC
134	-0,14	40	E	W	L	P	G	S	T	I	W	A	G	K	R	CCCCCCCCCCCCC
135	-0,61	32	A	Q	Q	N	D	W	E	A	T	D	P	A	F	CCCCCCCCCCCCC
136	-0,72	118	G	Y	D	N	V	E	S	Q	R	T	G	D	K	CCCCCCCCCCCCC
137	-1,02	88	D	S	M	T	S	Q	G	K	G	L	S	Q	G	CCCCCCCCCCCCC
138	-2,16	51	G	A	G	L	E	N	I	D	V	G	F	G	K	CCCCCCCCCCCCC
139	-3,24	50	S	G	P	G	A	G	L	E	N	I	D	V	G	CCCCCCCCCCCCC
140	-3,66	99	L	R	I	L	D	H	G	A	I	S	M	G	D	CCCCCCCCCCCCC
141	-6,34	2	T	L	R	K	L	P	L	A	V	A	V	A	A	CCCCCEEEEECCC
142	-7,20	4	L	A	V	A	V	A	A	G	V	M	S	A	Q	CEEECCCCCCCCC
143	-10,28	31	Y	S	V	A	Q	Q	N	D	W	E	A	T	D	CCCCCCCCCCCCC
144	-10,45	5	A	V	A	A	G	V	M	S	A	Q	A	M	A	CCCCHHCCCCCCC
145	-11,20	60	S	S	F	A	S	N	N	I	Y	D	Y	T	N	CCCCCCCCCCCCC
146	-16,01	3	K	L	P	L	A	V	A	V	A	A	G	V	M	CCCEEEHHHCCCC

Peptide der OmpF-Bibliothek nach rel. Affinitäten zu SurA sortiert, mit vorhergesagter Sekundärstruktur (PSIPRED V 2.3) und farbiger Markierung der Klassen (Klasse I grün, Klasse II gelb, Klasse III orange):

Laufindex	rel. Affinität	Peptid #	Peptidsequenz												vorherg. Sekundärstruktur	
1	100	106	Y	F	E	V	G	A	T	Y	Y	F	N	K	N	CEEEEEEEBCCC
2	91,73	55	N	S	N	F	F	G	L	V	D	G	L	N	F	CCCEEEBCCCCC
3	88,88	96	Q	F	D	F	G	L	R	P	S	I	A	Y	T	CCCCCCCCCCCC
4	86,93	56	F	F	G	L	V	D	G	L	N	F	A	V	Q	CCCHHCCCCCCC
5	85,41	54	T	Y	R	N	S	N	F	F	G	L	V	D	G	CCCCCEEEBCCC
6	79,34	53	G	V	A	T	Y	R	N	S	N	F	F	G	L	CCCEBCCCCCCCC
7	77,51	94	L	L	V	A	Q	Y	Q	F	D	F	G	L	R	CEEEEEBCCCCC
8	72,98	107	V	G	A	T	Y	Y	F	N	K	N	M	S	T	CCCEEEBCCCCC
9	70,55	110	N	M	S	T	Y	V	D	Y	I	I	N	Q	I	CCCHHHHHHHHCC
10	67,72	95	A	Q	Y	Q	F	D	F	G	L	R	P	S	I	CCCEEEBCCCCC
11	67,70	108	T	Y	Y	F	N	K	N	M	S	T	Y	V	D	CEEEBCCCCHCCC
12	67,10	105	L	V	N	Y	F	E	V	G	A	T	Y	Y	F	CCEEEEBCEEECC
13	63,20	90	N	T	S	G	F	A	N	K	T	Q	D	V	L	CCCCCCCCCCCC
14	55,36	40	F	D	Y	G	R	N	Y	G	V	V	Y	D	A	CCCCCCCCBEECC
15	54,16	97	F	G	L	R	P	S	I	A	Y	T	K	S	K	CCCCCCCCCCCC
16	52,97	11	N	K	V	D	L	Y	G	K	A	V	G	L	H	CCCEEBCCCCCCC
17	51,80	109	F	N	K	N	M	S	T	Y	V	D	Y	I	I	CCCCHHHHHHHCC
18	49,02	12	D	L	Y	G	K	A	V	G	L	H	Y	F	S	CCCCEEBCCCCC
19	47,32	39	V	G	S	F	D	Y	G	R	N	Y	G	V	V	CCCCCCCCCCCC
20	47,26	35	T	R	L	A	F	A	G	L	K	Y	A	D	V	CCEEBCCCEEECC
21	47,20	27	G	Y	G	Q	W	E	Y	N	F	Q	G	N	N	CCCCEEBCCCCC
22	46,46	41	G	R	N	Y	G	V	V	Y	D	A	L	G	Y	CCCCBEEBCCCC
23	45,90	38	Y	A	D	V	G	S	F	D	Y	G	R	N	Y	CCCCCCCCCCCC
24	45,71	18	N	S	Y	G	G	N	G	D	M	T	Y	A	R	CCCCCCCCCCCC
25	45,38	36	A	F	A	G	L	K	Y	A	D	V	G	S	F	CCCCCCCCCCCC
26	41,99	68	Y	E	Y	E	G	F	G	I	V	G	A	Y	G	CCCCCEBEECCCC
27	40,77	26	D	L	T	G	Y	G	Q	W	E	Y	N	F	Q	CCCCCCEEECCC
28	40,69	13	G	K	A	V	G	L	H	Y	F	S	K	G	N	CCCEEEBEECCCC
29	39,14	49	A	Y	S	D	D	F	F	V	G	R	V	G	G	CCCCCEEEBCCCC
30	38,51	57	L	V	D	G	L	N	F	A	V	Q	Y	L	G	CCCCHHHHHHHCC
31	38,13	52	R	V	G	G	V	A	T	Y	R	N	S	N	F	CCCEEBCCCCCCC
32	37,61	14	V	G	L	H	Y	F	S	K	G	N	G	E	N	CCBEEBCCCCCCC
33	36,94	34	G	N	K	T	R	L	A	F	A	G	L	K	Y	CCCEEEBEECCCC
34	35,98	111	T	Y	V	D	Y	I	I	N	Q	I	D	S	D	CCHHHHHHHHCCC
35	34,71	91	G	F	A	N	K	T	Q	D	V	L	L	V	A	CCCCCCEEEBEEC
36	34,51	83	I	Y	L	A	A	N	Y	G	E	T	R	N	A	CEEBCCCCCCCCC
37	34,15	79	Q	W	A	T	G	L	K	Y	D	A	N	N	I	CCCHHCCCCCCCC
38	32,54	93	Q	D	V	L	L	V	A	Q	Y	Q	F	D	F	CCEEEEBEECCCC
39	32,52	85	Y	G	E	T	R	N	A	T	P	I	T	N	K	CCCCCCCCCCCC
40	31,87	88	I	T	N	K	F	T	N	T	S	G	F	A	N	CCCCCCCCCCCC
41	31,82	89	K	F	T	N	T	S	G	F	A	N	K	T	Q	CCCCCCCCCCCC
42	31,44	86	T	R	N	A	T	P	I	T	N	K	F	T	N	CCCCCCCCCCCC
43	31,07	37	G	L	K	Y	A	D	V	G	S	F	D	Y	G	CCCCCCCCCCCC
44	30,96	28	Q	W	E	Y	N	F	Q	G	N	N	S	E	G	CEBEEBCCCCCCC
45	30,66	92	N	K	T	Q	D	V	L	L	V	A	Q	Y	Q	CCCCEEEEBEECC
46	30,63	67	S	I	S	Y	E	Y	E	G	F	G	I	V	G	CCCEEBCCCCCCC
47	30,22	74	N	L	Q	E	A	Q	P	L	G	N	G	K	K	CCCCCCCCCCCC
48	29,64	113	I	N	Q	I	D	S	D	N	K	L	G	V	G	CCCCCCCCCCCC
49	29,59	87	A	T	P	I	T	N	K	F	T	N	T	S	G	CCCCCCCCCCCC
50	29,29	114	I	D	S	D	N	K	L	G	V	G	S	D	D	CCCCCCCCCCCC
51	28,60	75	E	A	Q	P	L	G	N	G	K	K	A	E	Q	CCCCCCCCCCCC
52	28,00	116	L	G	V	G	S	D	D	T	V	A	V	G	I	CCCCCCCCBEECC
53	27,50	76	P	L	G	N	G	K	K	A	E	Q	W	A	T	CCCCCCCCCCCC
54	26,81	51	F	V	G	R	V	G	G	V	A	T	Y	R	N	CCCCCCCCCCCC
55	26,68	112	D	Y	I	I	N	Q	I	D	S	D	N	K	L	CCCCCCCCCCCC
56	24,74	33	A	Q	T	G	N	K	T	R	L	A	F	A	G	CCCCCCEBEECC
57	24,30	59	F	A	V	Q	Y	L	G	K	N	E	R	D	T	CEEBECCCCCCCC
58	24,25	77	N	G	K	K	A	E	Q	W	A	T	G	L	K	CCCHHHHHHCCCC
59	24,24	73	D	R	T	N	L	Q	E	A	Q	P	L	G	N	CCCCCCCCCCCC
60	23,17	15	H	Y	F	S	R	G	N	G	E	N	S	Y	G	CCCCCCCCCCCC
61	22,30	17	N	G	E	N	S	Y	G	G	N	G	D	M	T	CCCCCCCCCCCC
62	22,30	81	K	Y	D	A	N	N	I	Y	L	A	A	N	Y	CCCCCCEEEBEEC
63	21,74	58	G	L	N	F	A	V	Q	Y	L	G	K	N	E	CCCEEEBEECCCC
64	21,71	42	Y	G	V	V	Y	D	A	L	G	Y	T	D	M	CCBEEBCCCCCCC
65	21,29	50	D	D	F	F	V	G	R	V	G	G	V	A	T	CCBEEBCCCCCCC
66	19,64	98	R	P	S	I	A	Y	T	K	S	K	A	K	D	CCCCCCCCCCCC
67	19,19	117	G	S	D	D	T	V	A	V	G	I	V	Y	Q	CCCCCCEEEBEEC
68	18,63	115	D	N	K	L	G	V	G	S	D	D	T	V	A	CCCCCCCCCCCC
69	18,43	29	Y	N	F	Q	G	N	N	S	E	G	A	D	A	CCCCCCCCCCCC
70	18,42	78	K	A	E	Q	W	A	T	G	L	K	Y	D	A	CCCHHCCCCCCCC
71	17,48	48	G	D	T	A	Y	S	D	D	F	F	V	G	R	CCCCCCCCCCCC
72	17,09	16	S	K	G	N	G	E	N	S	Y	G	G	N	G	CCCCCCCCCCCC

73	16,81	9	I	Y	N	K	D	G	N	K	V	D	L	Y	G	CCCCCCEEECCC
74	16,69	84	A	A	N	Y	G	E	T	R	N	A	T	P	I	CCCCCCCCCCCC
75	16,63	62	E	R	D	T	A	R	R	S	N	G	D	G	V	CCCCCCCCCCCC
76	15,06	69	E	G	F	G	I	V	G	A	Y	G	A	A	D	CCCCCECCCCCC
77	15,01	72	G	A	A	D	R	T	N	L	Q	E	A	Q	P	CCCCCCCCCCCC
78	15,00	25	I	N	S	D	L	T	G	Y	Q	W	E	Y		CCCCCCCCCCCC
79	14,60	32	G	A	D	A	Q	T	G	N	K	T	R	L	A	CCCCCCCCCCCC
80	14,48	104	D	V	D	L	V	N	Y	F	E	V	G	A	T	CCCEEEEECCCC
81	14,44	102	D	V	E	G	I	G	D	V	D	L	V	N	Y	CCCCCCCCCCCC
82	14,32	10	K	D	G	N	K	V	D	L	Y	G	K	A	V	CCCEEEEECCCC
83	13,39	99	I	A	Y	T	K	S	K	A	K	D	V	E	G	CCCCCCCCCCCC
84	13,32	19	G	G	N	G	D	M	T	Y	A	R	L	G	F	CCCCCCEEECCC
85	12,40	66	V	G	G	S	I	S	Y	E	Y	E	G	F	G	CCCEEEEECCCC
86	12,25	21	T	Y	A	R	L	G	F	K	G	E	T	Q	I	CCCCCCCCCCCC
87	12,10	23	F	K	G	E	T	Q	I	N	S	D	L	T	G	CCCCCCCCCCCC
88	11,75	70	G	I	V	G	A	Y	G	A	A	D	R	T	N	CCCCCCCCCCCC
89	11,36	4	I	V	P	A	L	L	V	A	G	T	A	N	A	CCCEEEEECCCC
90	11,33	118	S	D	D	T	V	A	V	G	I	V	Y	Q	F	CCCEEEEEEEEC
91	10,99	103	G	I	G	D	V	D	L	V	N	Y	F	E	V	CCCCCCHHCCCC
92	10,72	60	Q	Y	L	G	K	N	E	R	D	T	A	R	R	CCCCCCCCCCCC
93	10,35	65	G	D	G	V	G	G	S	I	S	Y	E	Y	E	CCCCCCEEECCC
94	10,22	82	A	N	N	I	Y	L	A	A	N	Y	G	E	T	CCCEEEEECCCC
95	9,56	63	T	A	R	R	S	N	G	D	G	V	G	G	S	CCCCCCCCCCCC
96	9,34	43	V	Y	D	A	L	G	Y	T	D	M	L	P	E	CCCCCCCCCCCC
97	9,27	31	N	S	E	G	A	D	A	Q	T	G	N	K	T	CCCCCCCCCCCC
98	8,70	2	R	N	I	L	A	V	I	V	P	A	L	L	V	CCEEEHHHHHCC
99	8,60	22	R	L	G	F	R	G	E	T	Q	I	N	S	D	CCCCCCCCCCCC
100	8,59	71	G	A	Y	G	A	A	D	R	T	N	L	Q	E	CCCCCCCCCCCC
101	8,29	8	A	A	E	I	Y	N	K	D	G	N	K	V	D	CCCCCCCCCCCC
102	7,53	30	Q	G	N	N	S	E	G	A	D	A	Q	T	G	CCCCCCCCCCCC
103	7,32	47	E	F	G	G	D	T	A	Y	S	D	D	F	F	CCCCCCCCCCCC
104	7,23	61	G	R	N	E	R	D	T	A	R	R	S	N	G	CCCCCCCCCCCC
105	6,83	3	L	A	V	I	V	P	A	L	L	V	A	G	T	CCEHHHHHHHCC
106	6,36	80	T	G	L	K	Y	D	A	N	N	I	Y	L	A	CCCEEECCCCEEC
107	6,32	46	M	L	P	E	F	G	G	D	T	A	Y	S	D	CCCCCCCCCCCC
108	6,19	5	A	L	L	V	A	G	T	A	N	A	A	E	I	CEEECCCCCCCC
109	5,62	44	A	L	G	Y	T	D	M	L	P	E	F	G	G	CCHHHCCCCCCCC
110	5,10	20	G	D	M	T	Y	A	R	L	G	F	K	G	E	CCCEEECCCCCCC
111	4,93	64	R	S	N	G	D	G	V	G	G	S	I	S	Y	CCCCCCCCCCCC
112	4,29	24	E	T	Q	I	N	S	D	L	T	G	Y	G	Q	CCCCCCCCCCCC
113	3,94	45	Y	T	D	M	L	P	E	F	G	G	D	T	A	CCCCCCCCCCCC
114	3,55	6	V	A	G	T	A	N	A	A	E	I	Y	N	K	CCCCCCHHHHCC
115	2,87	101	K	A	K	D	V	E	G	I	G	D	V	D	L	CCCCCCCCCCCC
116	-1,99	1	M	M	K	R	N	I	L	A	V	I	V	P	A	CCCCCEEEEECCC
117	-2,92	100	T	K	S	K	A	K	D	V	E	G	I	G	D	CCCCCCCCCCCC
118	-2,94	7	T	A	N	A	A	E	I	Y	N	K	D	G	N	CCHHHHCCCCCCC

Peptide der OmpA-Bibliothek nach rel. Affinitäten zu SurA sortiert, mit vorhergesagter Sekundärstruktur (PSIPRED V 2.3) und farbiger Markierung der Klassen (Klasse I grün, Klasse II gelb, Klasse III orange):

Laufindex	rel. Affinität	Peptid #	Peptidsequenz	vorherg. Sekundärstruktur
1	100	10	WYTGAKLQWVSYH	CCCCCCCCCCCC
2	97,18	23	NPYVGFEMGYDNL	CCCEEECCCCCCC
3	90,86	12	LQWVSYHDTGFIND	CCCCCCCCCCCC
4	87,18	72	HFYTKSDVLFNFN	CCCEEECCCCCCC
5	79,59	11	GAKLQWVSYHDTG	CCCCCCCCCCCC
6	76,06	9	DNTWYTGAKLQWV	CCCEEECCCCCCC
7	70,40	44	NVYQKNDHTGVSP	CCCCCCCCCCCC
8	68,34	38	LDIYTRLLGGMVWR	CCHHHHCCCCCCC
9	68,15	61	GMLSLQVSYRFGQ	CCCEEECCCCCCC
10	64,17	21	EGGYQVNFYVGFQ	CCCEEECCCCCCC
11	62,07	39	YTRLLQGMVWRADT	CCCCCEEECCCC
12	55,21	73	LKSDVLFNFNKAAT	CCCEEECCCCCCC
13	52,68	26	YDNLGRMPYKGSV	CCCCCCCCCCCC
14	48,76	62	SLGVSYRFGQGEA	CCCCCCCCCCCC
15	48,16	71	QTKHFDTLKSDFLF	CCCEEECCCCCCC
16	47,62	22	YQVNFYVGFEMGY	CCCCCCCCCCCC
17	47,36	24	VGFEMGYDNLGRM	CCCCCCHHHHCC
18	46,79	25	EMGYDNLGRMPYK	CCCCHHCCCCCCC
19	42,34	41	MVWRADTKSNVYG	CCCCCCCCCCCC
20	39,33	105	NVQQRALIDCLA	CCCCHHHHHHHCC
21	39,32	20	AGAFGGYQVNFYV	CCCCCCCCCCCC
22	38,90	59	GTRPDNGLSLGV	CCCCCCEEECCC
23	38,61	3	AIAVALAGFAATVA	CEEEEECCCCEEC

24	37,87	43	T	K	S	N	V	Y	G	K	N	H	D	T	G	CCCCCCCCCCCC
25	34,74	53	A	T	R	L	E	Y	Q	W	T	N	N	I	G	CCCCEEEECCCC
26	32,75	29	K	G	S	V	E	N	G	A	Y	K	A	Q	G	CCCCCCCCCCCC
27	32,51	74	D	V	L	F	N	F	N	K	A	T	L	K	P	CEEEEECCCCCC
28	32,45	8	A	P	K	D	N	T	W	Y	T	G	A	K	L	CCCCCCCCCCCC
29	30,62	81	L	Y	S	Q	L	S	N	L	D	P	K	D	G	CCHHHCCCCCCC
30	29,95	6	A	T	V	A	Q	A	A	P	K	D	N	T	W	CCCCCCCCCCCC
31	29,63	42	R	A	D	T	K	S	N	V	Y	G	K	N	H	CCCCCCCCCCCC
32	29,51	91	Q	G	L	S	E	R	R	A	Q	S	V	V	D	CCHHHHHHHHCC
33	27,89	30	V	E	N	G	A	Y	K	A	Q	G	V	Q	L	CCCCCCCCCCCC
34	27,08	1	M	K	K	T	A	I	A	I	A	V	A	L	A	CCCEEEEEEECC
35	27,02	76	N	K	A	T	L	K	P	E	G	Q	A	A	L	CCCCCCCCCCCC
36	27,01	32	K	A	Q	G	V	Q	L	T	A	K	L	G	Y	CCCEEEEEEECC
37	26,99	93	R	A	Q	S	V	V	D	Y	L	I	S	K	G	CCHHHHHHHHCC
38	26,77	2	T	A	I	A	I	A	V	A	L	A	G	F	A	CEEEEEEECCCC
39	26,70	70	F	E	V	Q	T	K	H	F	T	L	K	S	D	CCCCCEEEBCCC
40	26,32	5	A	G	F	A	T	V	A	Q	A	A	P	K	D	CCHHHHCCCCCCC
41	26,12	33	G	V	Q	L	T	A	K	L	G	Y	P	I	T	CCEEEECCCCCCC
42	26,05	28	M	P	Y	K	G	S	V	E	N	G	A	Y	K	CCCCCCCCCCCC
43	25,82	102	N	P	V	T	G	N	T	C	D	N	V	K	Q	CCCCCCCCCCCC
44	25,49	4	V	A	L	A	G	F	A	T	V	A	Q	A	A	CCCCHHHHHHCCC
45	25,46	7	A	Q	A	A	P	K	D	N	T	W	Y	T	G	CCCCCCCCCCCC
46	25,42	75	F	N	F	N	K	A	T	L	K	P	E	G	Q	CCCCCCCCCCCC
47	25,20	52	P	E	I	A	T	R	L	E	Y	Q	W	T	N	CCCCEEEEEECCC
48	25,08	84	P	K	D	G	S	V	V	L	G	Y	T	D		CCCCEEEEEECCC
49	24,97	54	L	E	Y	Q	W	T	N	I	G	D	A	H		CCCEBCCCCCCCC
50	24,44	92	S	E	R	R	A	Q	S	V	V	D	Y	L	I	CCHHHHHHHHHCC
51	24,30	82	Q	L	S	N	L	D	P	K	D	G	S	V	V	CCCCCCCCCCCC
52	24,27	19	Q	L	G	A	G	A	F	G	G	Y	Q	V	N	CCCCCCCCCCCC
53	23,74	64	R	F	G	Q	G	E	A	A	P	V	V	A	P	CCCCCCCCCCCC
54	23,73	45	G	K	N	H	D	T	G	V	S	P	V	F	A	CCCCCCCCCCCC
55	23,04	63	V	S	Y	R	F	G	Q	G	E	A	A	P	V	CCCCCCCCCCCC
56	21,77	78	F	E	G	Q	A	A	L	D	Q	L	Y	S	Q	CCHHHHHHHHCC
57	21,66	90	A	Y	N	Q	G	L	S	E	R	R	A	Q	S	CCCCCCHHHHCCC
58	21,59	14	H	D	T	G	F	I	N	N	N	G	P	T	H	CCCCCCCCCCCC
59	21,49	31	G	A	Y	K	A	Q	G	V	Q	L	T	A	K	CCCCCEEEBCCC
60	21,32	69	A	P	A	P	E	V	Q	T	K	H	F	T	L	CCCCCCCCCCCC
61	21,22	49	A	G	G	V	E	Y	A	I	T	P	E	I	A	CCCCEEEECCCCC
62	21,04	99	I	S	A	R	G	M	G	E	S	N	P	V	T	CCCCCCCCCCCC
63	20,88	77	T	L	K	P	E	G	Q	A	A	L	D	Q	L	CCCCCCHHHHCCC
64	20,82	48	F	V	F	A	G	G	V	E	Y	A	I	T	P	CCCCCCCCBCCCC
65	20,32	67	V	V	A	P	A	P	A	P	A	P	E	V	Q	CCCCCCCCCCCC
66	19,87	51	A	I	T	P	E	I	A	T	R	L	E	Y	Q	CCHHHHHHCCCCC
67	19,31	40	L	G	G	M	V	W	R	A	D	T	K	S	N	CCCEEEBCCCCCC
68	19,26	60	P	D	N	G	M	L	S	L	G	V	S	Y	R	CCCEEEBCCCCCC
69	19,24	37	T	D	D	L	D	I	Y	T	R	L	G	G	M	CCCHHHHHCCCCC
70	19,07	35	K	L	G	Y	P	I	T	D	D	L	D	I	Y	CCCCCCCCCCCC
71	18,79	65	Q	G	E	A	A	P	V	V	A	P	A	P	A	CCCCCCCCCCCC
72	18,42	50	V	E	Y	A	I	T	P	E	I	A	T	R	L	CCCCCCHHHHCCC
73	18,36	79	Q	A	A	L	D	Q	L	Y	S	Q	L	S	N	CCHHHHHHHHCCC
74	18,32	27	L	G	R	M	P	Y	K	G	S	V	E	N	G	CCCCCCCCCCCC
75	18,11	56	N	N	I	G	D	A	H	T	I	G	T	R	P	CCCCCCCCCCCC
76	16,66	36	Y	P	I	T	D	D	L	D	I	Y	T	R	L	CCCCCCCCBCCCC
77	16,35	101	G	E	S	N	P	V	T	G	N	T	C	D	N	CCCCCCCCCCCC
78	16,28	100	R	G	M	G	E	S	N	P	V	T	G	N	T	CCCCCCCCCCCC
79	16,19	55	Q	W	T	N	N	I	G	D	A	H	T	I	G	CCCCCCCCCCCC
80	16,04	94	S	V	D	Y	L	I	S	K	G	I	P	A		CHHHHHHCCCCC
81	15,80	15	G	F	I	N	N	N	G	P	T	H	E	N	Q	CCCCCCCCCCCC
82	15,77	13	S	Q	Y	H	D	T	G	F	I	N	N	G		CCCCCCCCCCCC
83	15,68	83	N	L	D	P	K	D	G	S	V	V	L	G		CCCCCCCCBEECC
84	15,49	34	L	T	A	K	L	G	Y	P	I	T	D	D	L	CCCCCCCCCCCC
85	15,40	58	H	T	I	G	T	R	P	D	N	G	M	L	S	CCCCCCCCCCCC
86	14,79	80	L	D	Q	L	Y	S	Q	L	S	N	L	D	P	CHHHHHHHHCCCC
87	14,39	47	G	V	S	P	V	F	A	G	G	V	E	Y	A	CCCCCCCCCCCC
88	14,28	85	G	S	V	V	L	G	Y	T	D	R	I	G		CCEEEEBCCCCCC
89	13,83	88	D	R	I	G	S	D	A	Y	N	Q	G	L	S	CCCCCHHHHCCCC
90	13,36	98	A	D	K	I	S	A	R	G	M	G	E	S	N	CCCCCCCCCCCC
91	13,16	46	H	D	T	G	V	S	P	V	F	A	G	G	V	CCCCCCCCCCCC
92	12,87	68	P	A	P	A	P	A	P	E	V	Q	T	K	H	CCCCCCCCCCCC
93	12,81	95	D	Y	L	I	S	K	G	I	P	A	D	K	I	CCCCCCCCCCCC
94	12,42	16	N	N	N	G	P	T	H	E	N	Q	L	G	A	CCCCCCCCCCCC
95	11,33	57	G	D	A	H	T	I	G	T	R	P	D	N	G	CCCCCCCCCCCC
96	11,05	103	T	G	N	T	C	D	N	V	K	Q	R	A	A	CCCHHHHHHHHCC
97	10,63	104	T	C	D	N	V	K	Q	R	A	A	L	I	D	CCHHHHHHHHCCC
98	10,61	89	G	S	D	A	Y	N	Q	G	L	S	E	R	R	CCHHHHCCCCCCC
99	10,36	66	A	A	P	V	V	A	P	A	P	A	P	A	P	CCCCCCCCCCCC
100	10,32	110	R	R	V	E	I	E	V	K	G	I	K	D	V	CEEEEEBCCCCCC
101	9,53	109	A	P	D	R	R	V	E	I	E	V	K	G	I	CCCEEEEEBCCCC
102	8,00	86	V	V	L	G	Y	T	D	R	I	G	S	D	A	CCCCCCCCCCCC

103	7,10	17	G	P	T	H	E	N	Q	L	G	A	G	A	F	CCCCCCCCCCCC
104	6,05	87	G	Y	T	D	R	I	G	S	D	A	Y	N	Q	CCCCCCCCCCCC
105	5,90	96	I	S	K	G	I	F	A	D	K	I	S	A	R	CCCCCCCCCCCC
106	5,05	111	E	I	E	V	K	G	I	K	D	V	V	T	Q	CCCCCHHHHHCC
107	4,80	97	G	I	P	A	D	K	T	S	A	R	G	M	G	CCCCHHCCCCCCC
108	4,58	112	V	K	G	I	K	D	V	V	T	Q	P	Q	A	CCCHHHHHCCCC
109	3,52	18	H	E	N	Q	L	G	A	G	A	F	G	G	Y	CCCCCCCCCCCC
110	-0,99	106	Q	R	A	A	L	I	D	C	L	A	P	D	R	CCCEEECCCCCCC
111	-1,40	107	A	L	I	D	C	L	A	P	D	R	R	V	E	CCCCCCCCCCCC
112	-3,63	108	D	C	L	A	P	D	R	R	V	E	T	E	V	CCCCCCCCEECC

PERL-Skript zur Auszählung von Mustern und Aminosäure-Häufigkeiten. Die variablen Suchparameter sind farbig hervorgehoben:

```
#!/usr/bin/perl

use strict;

# my $pattern = '([FHYW])([A-Z])([FHYW])([A-Z]{1,7}?)([FHYW])';

my $pattern = '([FHYW])([A-Z])([FHYW])';
my ($name, $sequence);

while (<>) {
    chomp;
    if (/^>(.*)) {
        # Save the name for later use.
        $name = $1;
    }
    elsif (/^\s*$/) {
        if ($sequence) {
            # Perform search.
            my $n = 0;
            $sequence =~ s/\s*/g;
            my $seq2 = $sequence;
            while ($seq2 =~ /$pattern/g) {
                my $pos = $-[0] > length($sequence) ? -($-[0]-length($sequence)) : $-[0] + 1;
                printf("%d. %s;%d", ++$n, $name, $pos);
                for (my $i = 1; $i < @+; $i++) {
                    no strict 'refs';
                    print('; ', $$i);
                }
                print("\n");
            }
            if ($n == 0) {
                print("$name;no match\n");
            }
            $sequence = undef;
        }
    }
    else {
        # Append current line to sequence.
        $sequence .= $_;
    }
}
}
```


8.3 Danksagungen

Das Geheimnis um die Substratbindung von SurA konnte durch unzählige *blots*, Proteinreinigungen, Biacore-Experimente, Gedankenmodelle zum Ablauf der Substratbindung und nicht zuletzt durch EPR-Studien ein wenig gelüftet werden.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Susanne Behrens, die mich mit diesem sehr interessanten Thema betraut hat. Sie hat mich durch ihre unendliche Geduld, stete Diskussionsbereitschaft und sehr großes Engagement bei allen Vorhaben hervorragend unterstützt. Ich konnte sehr viel über ein mir vorher fast unbekanntes Thema lernen. Durch ihre sehr große Unterstützung konnte ich zudem viele interessante Methoden anwenden und spannende Fragestellungen angehen. Auch in schwierigen Zeiten, den langen Durststrecken des Forscheralltags, hat sie auf meine Fähigkeiten vertraut und mir mit Rat und Tat zu Seite gestanden.

Für die große Unterstützung dieser Arbeit und Diskussionsbereitschaft bei allen wissenschaftlichen Problemen sowie die freundliche Übernahme des Referates dieser Arbeit danke ich Wilfried Kramer ganz herzlich. Durch ihn sind mir immer neue Sichtweisen zu wissenschaftlichen Fragestellungen zuteil geworden.

Andreas Schwienhorst sei besonders für die Unterstützung bei allen Anliegen zur Peptidchemie und Analyse von Bindemustern sowie die freundliche Übernahme des Korreferates gedankt.

Für die Beratung in allen Fragen zur Chemie und für die Synthese unzähliger Peptide möchte ich Daniel Riester auf das Herzlichste danken.

Ebenso hat Harald Kolmar durch seine guten Ideen und Ratschläge immer ein anderes, oft erhellendes Licht auf verschiedenste wissenschaftliche Fragen geworfen, wofür ich ihm herzlich danke.

Meine mathematischen und bioinformatischen Kenntnisse wurden durch Christian Schröder geduldig erweitert und gefördert. Besonders für die Bereitstellung von PERL-Skripten und die Analyse meiner Peptide mit seinem Algorithmus sei ihm herzlich gedankt.

Die Biacore-Studien wurden durch die Bereitstellung von Geräten und wissenschaftlicher Hilfestellung ermöglicht. Dafür möchte ich Manfred Konrad am MPI für biophysikalische Chemie und Petra Steinacker im Neurobiologischen Labor des Universitätsklinikums zu Göttingen danken. Ebenso hat mich Uwe Bierfreund bei allen Fragen rundum Biacore immer betreut, wofür ihm ebenfalls großer Dank gebührt.

Für Bereitstellung der Peptid-Bibliotheken danke ich Jens Schneider-Mergener und Rudolf Volkmer-Engert.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen angefertigt. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und Unterstützung dieser Arbeit

danke ich Prof. Hans-Joachim Fritz.

Es sei Holger Patzelt, Anna Rutkowska, Frieder Merz und Elke Deuerling für die Hilfestellung bei den Peptid-Bibliotheken, den Fluoreszenz-Messungen und den faszinierenden Diskussionen über Chaperone herzlich gedankt.

Mit ihrer Hilfe bei der EPR-Spektroskopie, praktisch wie theoretisch, haben Derek Marsh und Brigitta Angerstein einen erheblichen Beitrag zur Erschließung dieser schönen, wenn auch recht komplizierten Methode geleistet. Dafür mein herzlichster Dank an dieser Stelle!

Für die unermüdliche Reinigung meiner unzähligen Glaswaren danke ich Marlies Bartels und Angelika Löffers ganz herzlich. Das Gelingen dieser Arbeit wurde aber auch durch die vielen aufmunternden und durchaus lehrreichen Gespräche mit Marita Kalck, Olaf Waase und Rainer Merkl, der mir in bioinformatischen Problemen immer zur Seite stand, ermöglicht. Die ganze Abteilung, allen voran Bettina Hucke, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Einsatz eine große Stütze ist, Rene Hempel, Thorsten Adams, Ulli Schmoldt, Stefan Becker, Martin Daneschadar, Evandro Panico, Jan Lukas, Birgit Zeike, Christiane Preiss, Eva Kansy, Stina Schiller, Anke Schürer, Alexander Wentzel, Andreas Christmann, Christian Hildmann, Dennis Wegener und Alle, die ich vergessen habe, hat ein unvergleichlich nettes Arbeitsklima bereitgestellt.

Besonders *erfrischend* waren die Unterhaltungen über verschiedenste Themen mit Christian Rudolph und Wilfried Kramer.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für Finanzierung meiner Arbeit durch den Grant (Be 2030/4-1)

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Behrens speziell Saskia Flörl, Jennifer Uhlendorff, Pia Kaplanek, Konstanze Barthel, Georg Kren, Sven Pilarski, Olga Karoljow, Jessica Eggers und Sandra Seelke danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit und des täglichen Laborablaufs.

Für das Korrekturlesen danke ich Christian Rudolph, Arne Schäfer, Matthias Prüfer, Sandra Seelke und Saskia Flörl

Den Mitgliedern des Göttinger Genomics Laboratory danke ich für gute Sequenzierung meiner Plasmide.

Ein großer Dank gilt auch meinen Brüdern, Bianca sowie allen Freunden, die mich auf diesem Weg begleitet und diese Arbeit unterstützt haben.

8.4 Lebenslauf

Name:	Gerrit Hennecke
Geburtsdatum:	13.04.1975
Geburtsort:	Göttingen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbildung:	1981-1994 Freie Waldorfschule Göttingen
Zivildienst:	1994-1995 im Klinikum Göttingen
Studium der Biologie:	1997-1999 an der Johannes Gutenberg Universität zu Mainz 1999-2002 an der Georg-August Universität zu Göttingen
Diplomarbeit:	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik bei PD Dr. H. Kolmar
Dissertation:	Seit August 2002 experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation in der Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen durch Finanzierung der DFG (Be 2030/4-1)