

Elisa Winterer

**Untersuchungen zur Struktur und
Funktion der Transportdomänen
des Autodisplay Systems**



Cuvillier Verlag Göttingen

Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Transportdomänen des Autodisplay Systems

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Elisa Winterer

aus Saarlouis

Januar 2009

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d b.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2010

Zugl.: Düsseldorf, Univ. Diss., 2009

978-3-86955-248-4

aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Joachim Jose

Koreferent: Prof. Dr. Matthias Kassack

Tag der mündlichen Prüfung:

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2010

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2010

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-248-4

MEINER FAMILIE

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 13. Januar 2009

(Elisa Winterer)

Ich danke

Professor Dr. Joachim Jose für die Möglichkeit der Promotion und die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis. Vielen Dank auch für die Betreuung, Unterstützung und die Geduld.

Professor Dr. Matthias Kassack für die Übernahme des Koreferats und die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Praktikumsbetreuung.

Allen Kolleginnen und Kollegen, sowie allen Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima. Eure Diskussionsbereitschaft und Eure Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Nora Stellisch und Karin Voigt für die Unterstützung bei meinen Projekten insbesondere in der „heißen Phase“.

Dirk Betscheider und Andreas Gratz für die Durchführung meiner FACS-Messungen.

Thao Mi Tran Xuan und Bettina Conradt für die Mitarbeit im Rahmen ihres Wahlpflichtpraktikums.

Klaudia Petermann, Eva Kranen und Ruth Maas für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die konstruktive Kritik.

Urban Baltes für das Korrekturlesen und die Hilfestellung bei der Endformatierung.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben und für mich da waren.

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	1
2	ZUSAMMENFASSUNG	7
3	SUMMARY	8
4	EINLEITUNG	9
4.1	Die Zellhülle gramnegativer Bakterien	9
4.2	Sekretionsmechanismen gramnegativer Bakterien	9
4.2.1	Typ-I-Sekretion	10
4.2.2	Typ-II-Sekretion	10
4.2.3	Typ-III-Sekretion	11
4.2.4	Typ-IV-Sekretion	11
4.2.5	Typ-V-Sekretion	11
4.2.6	Typ-VI-Sekretion	13
4.3	Das Autodisplay-System	13
4.3.1	Oberflächenexpression auf Mikroorganismen	13
4.3.2	Oberflächenexpression mit Hilfe von Autotransportern	15
4.3.3	Autodisplay als effektive Methode zur Oberflächenexpression	16
4.4	Erkenntnisse zu Struktur und Funktion der Transportdomänen von AIDA-I aus <i>E. coli</i>	19
4.5	Ziel der Arbeit	21
5	MATERIAL	23
5.1	Bakterienstämme	23
5.2	Plasmide	24
5.3	Oligonukleotide	25
5.4	Enzyme	27
5.5	Medien, Puffer und Lösungen	27
5.5.1	Medien	27
5.5.2	Puffer und Lösungen	29

6	METHODEN	35
6.1	Arbeiten mit Bakterien	35
6.1.1	Anzucht	35
6.1.2	Stammhaltung	35
6.1.3	Bestimmung der optischen Dichte	36
6.1.4	Induktion der Proteinexpression	36
6.1.5	Markierung von Bakterienzellen für die Durchflusszytometrie	36
6.1.6	Herstellung elektrokompenter Zellen	38
6.1.7	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	38
6.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren	39
6.2.1	Plasmidisolierung mit im Handel erhältlichen Kits	39
6.2.2	Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly (modifiziert)	39
6.2.3	Restriktionsendonukleaseverdau	39
6.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	40
6.2.5	Färbung von Agarose-Gelen	40
6.2.6	Gelextraktion	40
6.2.7	DNA-Konzentrationsbestimmung	40
6.2.7.1	Konzentrationsbestimmung im UV-Licht	41
6.2.7.2	Konzentrationsbestimmung über die Bandenvergleichsmethode	41
6.2.8	DNA-Fällung	41
6.2.9	Denaturierung doppelsträngiger Plasmid-DNA	41
6.2.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
6.2.11	Dephosphorylierung	42
6.2.12	Ligation	43
6.2.13	Klonierung von PCR-Amplifikaten	43
6.2.14	Ortsgerichtete Mutagenese	44
6.2.15	Transformation elektrokompenter Zellen	46
6.2.16	Transformation chemisch kompetenter Zellen	46
6.2.17	DNA-Sequenzanalyse	46
6.3	Arbeiten mit Proteinen	47
6.3.1	Außenmembranproteinpräparation	47
6.3.2	Proteaseverdau ganzer Zellen	48
6.3.3	Fällung löslicher Proteine mit Trichloressigsäure	49
6.3.4	Hitzedenaturierung höherer Strukturen bakterieller Proteine	49
6.3.5	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
6.3.6	Färbung von SDS-Gelen	50
6.3.7	Western Blot	51
6.3.8	Immunofärbung	51
6.3.9	Sequenzanalyse durch Edman-Abbau	52
6.3.10	Sequenzanalyse durch Peptide-Mass-Fingerprinting	52

1	Inhaltsverzeichnis	3
6.4	Chemikalien	52
6.5	Geräte	53
7	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	55
7.1	Evolution im Labor durch spontane Mutationen in den Transportdomänen des Autodisplay Systems	55
7.1.1	Spontane Mutationen in den Transportdomänen des Autodisplay Systems	55
7.1.2	Mutationsanalyse der Transportdomänen weiterer Autodisplay Konstrukte	56
7.1.2.1	Spontane Mutationen in den Varianten des Ausgangsproteins, die durch die Plasmide pJM007 und pJM1013 kodiert werden	56
7.1.2.2	Mutationen im Ausgangsprotein	57
7.1.3	Einfluss von vier Aminosäureaustauschen im β -Fass auf das Autodisplay eines linearen Epitops	58
7.1.3.1	Expression und Membranständigkeit der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S in <i>E. coli</i> UT5600(DE3)	60
7.1.3.2	Oberflächenständigkeit eines Epitops als Passagier der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S in <i>E. coli</i> UT5600(DE3)	61
7.1.4	Einfluss zweier verschiedener Signalpeptidaseschnittstellen auf das Autodisplay eines linearen Epitops	63
7.1.4.1	Expression und Membranständigkeit der Mutante E21G	64
7.1.4.2	Oberflächenständigkeit eines linearen Epitops als Passagier der Mutante E21G	65
7.2	Einfluss verschiedener C-terminaler Aminosäuren auf die Integration und den Transport der Passagierdomäne des Ausgangsproteins	66
7.2.1	Konstruktion der C-terminalen Mutanten des Ausgangsproteins mittels ortsgerichteter Mutagenese	69
7.2.2	Nachweis der Deletion des C-terminalen Phenylalanins in der Mutante F485*	69
7.2.3	Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in <i>E. coli</i> UT5600(DE3)	72
7.2.4	Oberflächenständigkeit des Passagiers des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in <i>E. coli</i> UT5600(DE3)	74
7.2.5	Einfluss der Wirtsstämme <i>E. coli</i> BL21(DE3) und <i>E. coli</i> JK321(DE3) auf die Expression des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten	76
7.2.5.1	Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminaler Mutanten in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	76
7.2.5.2	Oberflächenständigkeit des Passagiers des Ausgangsproteins und seiner C-terminaler Mutanten in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	78
7.2.5.3	Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminaler Mutanten in <i>E. coli</i> JK321(DE3)	80
7.2.5.4	Oberflächenständigkeit des Passagiers des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in <i>E. coli</i> JK321(DE3)	82

7.3	Charakterisierung der zwei Expressionsformen des Ausgangsproteins	83
7.3.1	Nachweis der Faltung des Ausgangsproteins	86
7.3.2	Nachweis der Faltung der Mutante F485V	87
7.3.3	Nachweis der Oberflächenständigkeit des Passagiers des Ausgangsproteins durch Verdau mit extrazellulär zugesetzten Proteasen	89
7.3.4	Nachweis der Oberflächenständigkeit eines Passagiers des Ausgangsproteins durch Verdau mit einer außenmembranständigen Protease	90
7.3.5	Unterschiedliche Löslichkeit der beiden Formen des Ausgangsproteins im Detergenz N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium	96
7.3.6	Massenspektrometrische Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenzen der beiden Formen des Ausgangsproteins	98
7.3.7	Nachweis der Prozessierung und Lage der Signalpeptidaseschnittstelle in der funktionellen Form des Ausgangsproteins	99
7.3.8	Einfluss der Signalpeptidaseschnittstelle auf die Prozessierung des Ausgangsproteins mit einem anderen Passagier	101
7.3.9	Bestimmung der Anzahl oberflächenständiger Passagiermoleküle	103
7.4	Optimierung der Expression der funktionellen Variante des Ausgangsproteins	107
7.4.1	Vergleich der konstitutiven mit der induzierten Proteinexpression	107
7.4.2	Einfluss eines weiteren, induzierbaren Expressionssystems auf die beiden Varianten des Ausgangsproteins	111
7.4.3	Einfluss der Induktionstemperatur auf die Expression und Integration der beiden Formen des Ausgangsproteins	114
7.4.4	Einfluss der Induktionszeit auf die Expression und Integration der beiden Formen des Ausgangsproteins	116
7.4.5	Einfluss der IPTG-Konzentration auf die Expression und Integration der beiden Formen des Ausgangsproteins	119
7.4.6	Koexpression mehrerer Chaperone und Katalysatoren der Faltung und ihr Einfluss auf das Autodisplay	123
8	DISKUSSION	129
8.1	Evolution im Labor	129
8.2	Einfluss der carboxyterminalen Aminosäure der Transportdomäne auf die Integration und die Oberflächenständigkeit des Passagiers	131
8.3	Die beiden Varianten des Ausgangsproteins	137
8.4	Optimierung der Bildung der funktionellen Form des Ausgangsproteins	142
9	LITERATUR	147

10	ANHANG	157
10.1	Abkürzungsverzeichnis	157
10.2	Abbildungsverzeichnis	159
10.3	Publikationen	161
10.3.1	Zeitschriftenbeiträge	161
10.3.2	Tagungsbeiträge	161
10.3.3	Preise	162

2 Zusammenfassung

Mit Autodisplay steht ein System zur Verfügung, das die Präsentation eines funktionellen Passagierproteins auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die carboxyterminale Aminosäure (Phenylalanin) der β -Fass-Domäne des Autodisplay-Systems ausgetauscht. Sie wurde mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese durch Tryptophan, Tyrosin, Histidin oder Valin ersetzt oder vollständig deletiert. Aromatische Aminosäuren konnten ohne Funktionsverlust gegeneinander getauscht werden. Durch Untersuchungen an der Valin-Mutante (hydrophob, aber nicht aromatisch) wurde nachgewiesen, dass die Integration oder der Transport, aber nicht die Konformation des Proteins beeinträchtigt war. Wurde die C-terminale Aminosäure deletiert, konnte kein außenmembranständiges Protein detektiert werden. Damit konnte ein direkter Einfluss der Aromatizität des C-Terminus auf die Integration in die äußere Membran nachgewiesen werden. Im Laufe der Zeit kam es durch Evolution und Selektion zu sieben Aminosäureaustauschen in den Transportdomänen. Die Mutationen hatten keinen Einfluss auf die in dieser Arbeit untersuchten Eigenschaften des Autodisplay, wie beispielsweise die Menge an oberflächenständigem Passagier. Durch Überexpression entstanden zwei unterschiedliche Proteinformen. Nur eine Form zeigte das für β -Fass Proteine typische Verhalten der Hitzedenaturierung und präsentierte ihre Passagierdomäne auf der Oberfläche. Die andere Form befand sich in einer nicht funktionellen Konformation und transportierte den Passagier nicht über die äußere Membran. Durch eine Analyse der N-terminalen Proteinsequenz wurde nachgewiesen, dass nur das funktionelle Protein durch die Signalpeptidase prozessiert worden war. Durch Solubilisierung im Detergenz N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium gelang es, die beiden Formen voneinander zu trennen. Das funktionelle Protein verhielt sich dabei genau wie das als Indikatorprotein dienende natürliche Außenmembranprotein OmpA, das ebenfalls ein β -Fass ausbildet. Die Proteinexpression konnte durch Änderung der Induktionsbedingungen soweit optimiert werden, dass nur noch die funktionelle Variante gebildet wurde und ohne dass die Faltung der Struktur oder die Zahl der oberflächenständigen Passagiermoleküle beeinträchtigt war. Durch die Koexpression der periplasmatischen Chaperone SurA, FkpA, DsbA und DsbC konnte die Menge an oberflächenständigem Protein verdoppelt werden.

3 Summary

Autodisplay represents a system which enables the presentation of a functional passenger protein on the surface of *E. coli* cells. In the context of this thesis the carboxyterminal amino acid (phenylalanine) of the β -barrel-domain of the autodisplay system was exchanged. With the help of site-directed mutagenesis, phenylalanine was deleted or replaced by tryptophane, tyrosine, histidine or valine. Aromatic amino acids could be changed against each other without a loss of function. Through analysis of the valine-mutant (hydrophobic, but not aromatic) it was demonstrated that the integration or the transport, but not the conformation of the protein was affected. If the C-terminal amino acid was deleted, no protein could be detected on the surface of the outer membrane. Therefore, the aromaticity of the C-terminus proved to be of direct influence on the integration in the outer membrane. In the course of time seven amino acid exchanges occurred in the transport domains of the autodisplay due to evolution and selection. No influence of the mutated amino acids on the analysed characteristics of the autodisplay, e.g. the amount of surface displayed passenger, could be substantiated. Due to overexpression two different protein forms were generated. Only one of them displayed the typical behaviour of β -barrel proteins, such as thermal denaturation, and enabled the presentation of the passenger domain on the surface. The other form was situated in a nonfunctional conformation and was not able to transport the passenger across the outer membrane. Through analysis of the N-terminal protein sequence of both variants it was possible to verify that only the functional protein was processed by the signal peptidase. It was possible to separate the two forms through solubilization in the detergent N-lauroyl-sarcosinate-sodium. Thereby, the functional protein displayed the same behaviour as the common outer membrane protein OmpA, which represents a typical β -barrel protein and was used as a control. The protein expression could be optimized through changes in the induction conditions to such an extent that only functional protein was generated without impairment of structural functionality or amount of passenger molecules on the surface. Through coexpression of the periplasmic chaperones SurA, FkpA, DsbA and DsbC a twofold increase of surface exposed passenger protein could be achieved.

4 Einleitung

4.1 Die Zellhülle gramnegativer Bakterien

Eine heute noch gültige Klassifizierung von Bakterien aufgrund ihrer Eigenschaft, sich in einer speziellen Färbe-Technik unterschiedlich zu färben, wurde Ende des 19. Jahrhunderts durch den dänischen Arzt Hans Christian Gram eingeführt (Gram, 1884). Diese Unterteilung konnte vorgenommen werden, da sich Bakterien grundlegend in der Beschaffenheit ihrer Zellhülle unterscheiden. Ausgehend vom Zytosol schließt sich bei beiden eine Einheitsmembran aus Phospholipiden an, die Zytoplasmamembran, die bei gramnegativen Bakterien innere Membran (IM) heißt (Madigan *et al.*, 2000). Die Grampositiven besitzen anschließend an diese Membran eine mehrschichtige Mureinhülle. Die Gramnegativen besitzen auf ihrer Zytoplasmamembran nur eine dünne Mureinschicht (Zellwand). Dieser ist eine weitere Membran, die äußere Membran (OM), aufgelagert. Die OM setzt sich aus einer Doppelschicht von Phospholipiden und Lipopolysacchariden zusammen. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenität der gramnegativen Bakterien und schirmt den intermembranären Raum, das Periplasma, nach außen ab. In die äußere Membran sind zahlreiche Proteine integriert (Cordwell, 2006). Dazu gehören beispielsweise Außenmembranproteine, wie Porine, oder Lipoproteine, die mit ihrem N-terminalen Lipidanteil in der Membran verankert sind (Pugsley, 1993; Narita und Tokuda, 2006). Zu den gramnegativen Bakterien zählen neben *Escherichia coli* beispielsweise auch *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis* und *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2 Sekretionsmechanismen gramnegativer Bakterien

Bisher wurde eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die von gramnegativen Bakterien sekretiert werden. Diese Proteine erfüllen unterschiedlichste Aufgaben (Cordwell, 2006). Sie sind in die bakterielle Kommunikation involviert und ermöglichen, indem sie Poren bilden, den Fluss von Nährstoffen in die Zelle und von toxischen Beiproducten und Xenobiotika aus der Zelle heraus. Sie sind darüber hinaus ausschlaggebend für di-

verse pathogene Prozesse wie Beweglichkeit, Kolonisierung und Anhaftung an Wirtszellen. Bevor die Moleküle in den Extrazellulärraum abgegeben oder auf der Oberfläche präsentiert werden können, müssen sie über die bakterielle Zellhülle transportiert werden. Die Mechanismen, über die dieser Transport zustande kommt, können in sechs Klassen eingeteilt werden, die als Typ-I-VI bezeichnet werden (Henderson *et al.*, 2004; Jose und Meyer, 2007; Blocker *et al.*, 2008; Craig und Li, 2008; Davidson *et al.*, 2008; Filloux *et al.*, 2008; Hazes und Frost, 2008).

4.2.1 Typ-I-Sekretion

Das Typ-I-Sekretionssystem besteht aus 3 Proteinen: einem porenbildenden Außenmembranprotein, einem Membran-Fusions-Protein (MFP) und einem an der inneren Membran gelegenen ATP-Binding-Cassette (ABC) Protein (Gentschev *et al.*, 2002). Die Sekretion erfolgt dabei in einem kontinuierlichen Prozess unter Hydrolyse von ATP über die Membranen, wobei das transportierte Molekül nicht prozessiert wird. Als Prototyp eines bakteriellen Proteins, das mit Hilfe dieses Mechanismus transportiert wird, gilt das α -Hämolyysin (HlyA) aus *E. coli*. Der Mechanismus findet nicht nur beim Proteintransport in prokaryontischen Zellen Anwendung, sondern auch beispielsweise beim Transport kleiner Moleküle in eukaryontischen Zellen im Rahmen der Ausbildung von Resistenzmechanismen („multiple drug resistance“) gegen verschiedenste Zytostatika in Karzinomzellen unterschiedlichster Ätiologie (Ambudkar *et al.*, 1999; Gottesman *et al.*, 2002).

4.2.2 Typ-II-Sekretion

Die Typ-II-Sekretion erfolgt über ein System von zwei sich ergänzenden Transportwegen, die sich aus zahlreichen Proteinen zusammensetzen (Hueck, 1998). Sieben dieser Proteine sind in der Zytoplasmamembran lokalisiert und bilden die Sec-Translokationsmaschinerie. Sie besteht aus einer ATPase, SecA, einigen in die innere Membran integrierten Proteinen (SecD, SecE, SecF, SecG und SecY) und einer Signalpeptidase. Zwölf bis fünfzehn weitere Proteine bilden das so genannte Sekreton. Das zu transportierende Protein wird unter ATP-Hydrolyse durch SecA mit Hilfe der Translokase SecYEG und der regulatorischen Untereinheiten SecD und SecF über die Zytoplasmamembran transportiert (Economou, 1999). Die Signalpeptidase spaltet das Signalpeptid

am N-Terminus ab und setzt das Protein ins Periplasma frei, wo es mit Hilfe von Chaperonen in einen der nativen Konformation ähnlichen Zustand überführt wird (Sandkvist, 2001). Anschließend wird das Protein durch das Sekreton über die äußere Membran in das umgebende Medium ausgeschleust (Hazes und Frost, 2008). Als typisches Beispiel für diesen Weg gilt die Pullulanase (PulA) aus *Klebsiella oxytoca*.

4.2.3 Typ-III-Sekretion

Bei der Typ-III-Sekretion besteht das Transportsystem aus 20 unterschiedlichen Komponenten (Hueck, 1998; Blocker *et al.*, 2008). Das zu transportierende Protein wird dabei unabhängig vom Sec-System ausgeschleust. Es bildet sich eine Pore und eine dadurch stabilisierte nadelartige Struktur, die beide Membranen durchspannt. Dieser Komplex wird als „Injektisom“ bezeichnet und ermöglicht ein direktes Einbringen des Effektormoleküls, beispielsweise des YopH Proteins aus *Yersinia* spp., in eukaryontische Zellen.

4.2.4 Typ-IV-Sekretion

Bei der Typ-IV-Sekretion wird die Passage über die innere Membran noch diskutiert. Es könnte sowohl ein 2-Stufen-Mechanismus wie bei der Typ-II-Sekretion sein, als auch ein direkter Transport vom Cytosol des Bakteriums in die Wirtszelle (Henderson *et al.*, 2004). Bei *Agrobacterium tumefaciens* ist der Mechanismus am Besten untersucht. Aus mehreren Effektormoleküluntereinheiten setzt sich ein Pilus zusammen, der die Membran durchspannt (Christie, 2000). Es bildet sich ein Nukleoprotein bestehend aus ss-DNA und einem Akzeptorprotein, welches durch den Pilus ins Zytosol der Wirtszelle gelangt. Das Akzeptorprotein trägt ein Kernlokalisierungssignal, das den Transport des Nukleoproteins in den Nukleus der Wirtszelle veranlasst. Der DNA-Anteil wird in das Wirtsgenom integriert und führt zur Bildung von tumorähnlichen Gebilden, so genannten Cecidien (Henderson *et al.*, 2004).

4.2.5 Typ-V-Sekretion

Die Typ-V-Sekretion wird in drei verschiedene Mechanismen unterteilt: Typ Va, Typ Vb und Typ Vc. Die Informationen für alle Bestandteile des Typ-Va-Sekretionssystems oder Autotransporter-Sekretionsmechanismus sind in einem einzigen Gen kodiert

(Pohlner *et al.*, 1987). Dieses Gen wird in ein Vorläuferprotein übersetzt, das aus vier Domänen besteht: Signalpeptid, Passagier, Linker und β -Fass. Das Signalpeptid wird von SecA erkannt und das Vorläuferprotein in den Sec-Translokationsweg eingeschleust, der es über die innere Membran transportiert (Economou, 1999). Nach dem Transport wird das Signalpeptid abgespalten (Shikata *et al.*, 1992; Charles *et al.*, 1994). Im Periplasma faltet sich nach dem ursprünglichen Modell (Pohlner *et al.*, 1987; Jose *et al.*, 1995) der C-Terminus spontan in die Außenmembran ein und bildet eine Pore aus amphipathischen, gegenläufigen β -Faltblättern, das so genannte β -Fass. Im β -Fass sind hydrophobe und hydrophile Aminosäuren in einem alternierenden Muster angeordnet, wobei die hydrophoben nach außen gerichtet sind und den Kontakt mit der umgebenden Membran herstellen. Die Linkerregion schleust sich durch diese Pore aus und formt dabei eine so genannte Haarnadelstruktur (Benjelloun-Touimi *et al.*, 1995; Jose *et al.*, 1995), mit deren Hilfe der Passagieranteil nach außen geschleust wird. Mit der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Translokationseinheit von NalP aus *Neisseria meningitidis* (Oomen *et al.*, 2004) und von EspP aus *E. coli* (Barnard *et al.*, 2007) mittels Röntgenkristallographie konnte nachgewiesen werden, dass die Linkerdomäne in Form einer α -Helix das hydrophile Innere des β -Fasses durchzieht. Die Struktur belegt damit das vorausgesagte Modell. Neben diesem Modell existieren noch zwei weitere Entwürfe zum Mechanismus der Typ-Va-Sekretion. Die Arbeitsgruppe um Tommassen postulierte, dass das hochkonservierte, bakterielle Protein Omp85 bei der Sekretion von Autotransporterproteinen eine Rolle spielt (Bos *et al.*, 2007; Tommassen, 2007). Omp85 könnte dabei die Integration des gefalteten β -Fasses in die äußere Membran vermitteln. Der Passagier wird entweder über ein Omp85 Molekül oder über das integrierte β -Fass selbst ausgeschleust. Veiga *et al.* propagierten 2002 die Bildung einer oligomeren Ringstruktur. Diese setzt sich aus mindestens sechs vollständig integrierten β -Fässern zusammen. Die Passagiere aller beteiligten Autotransporter schleusen sich dabei durch die aus allen Monomeren gebildete, zentrale Pore aus (Veiga, 2002).

Die Sekretion vom Typ Vb wird auch als „Two-Partner-Secretion-Pathway“ bezeichnet (Jose und Meyer, 2007). Sie dient dem Transport von sehr großen Proteinen (>100 kDa) wie FhaB aus *Bordetella pertussis* (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Das β -Fass und die Passagierdomäne werden durch zwei unterschiedliche Gene kodiert. Sie werden getrennt voneinander über die innere Membran ins Periplasma transportiert, wo sich das β -

Fass in die äußere Membran integriert. Die Passagierdomäne schleust sich durch die dabei entstehende Pore aus.

Bei der Sekretion vom Typ Vc entstehen oligomere Autotransporter (Hoiczky *et al.*, 2000). Der Prototyp, YadA aus *Yersinia pestis*, bildet ein Trimer. Jedes Monomer steuert vier β -Faltblätter zur Bildung der zentralen Pore bei. Die Passagierproteine werden durch das β -Fass nach außen transportiert, wo sie eine „Lollipop“-artige Struktur ausbilden.

Die translozierten Moleküle werden nach dem Export entweder proteolytisch abgespalten und ins umgebende Medium sezerniert (Pohlner *et al.*, 1987), oder sie bleiben, wie beispielsweise AIDA-I aus *E. coli* oder Hia aus *Hämophilus influenzae*, mit der Bakterienoberfläche verbunden (Benz und Schmidt, 1992b; St Geme *et al.*, 1996).

4.2.6 Typ-VI-Sekretion

Der Typ-VI-Sekretionsweg wurde erst vor kurzer Zeit charakterisiert. Sein Mechanismus ist noch in weiten Teilen unbekannt. Einige Proteine, wie die ClpV ATPase und das membranständige IcmF konnten dem System zugeordnet werden (Cascales, 2008; Filloux *et al.*, 2008). Der Transport über die innere Membran erfolgt unter Hydrolyse von ATP als Energiespender. Ein Signalpeptid wird nicht abgespalten. Vermutlich bildet sich aus verschiedenen Untereinheiten eine Art Kanal, mit dessen Hilfe Proteine in den Extrazellulärraum sekretiert werden können. Als Prototyp für diesen Weg gelten Hcp und VgrG aus *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et al.*, 2006).

4.3 Das Autodisplay-System

4.3.1 Oberflächenexpression auf Mikroorganismen

Die Präsentation von rekombinanten Proteinen auf der Oberfläche von Mikroorganismen („Surface Display“) ist ein viel versprechender Ansatz für viele biotechnologische Anwendungen (Samuelson *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003). Werden Moleküle auf der Oberfläche von Zellen präsentiert, sind sie frei zugänglich für mögliche Substrate und Bindungspartner in Aktivitäts- oder Bindungsstudien (Jose und Meyer, 2007). Die Zellen können nach ihrer Verwendung einfach durch Sedimentation aus dem Reaktionsan-

satz entfernt werden. Eine aufwendige Aufreinigung und Aufbereitung entfällt. Proteine weisen eine höhere Stabilität auf, wenn sie an eine Matrix wie die Zellhülle gebunden sind. Die Oberflächenpräsentation liefert Vorteile für die Erstellung und Durchmusterung von Peptid- oder Proteinbibliotheken. Durch die Kopplung von präsentiertem Protein und Zelle ist gleichzeitig das korrespondierende Gen als internes Label verknüpft. Die DNA kann schnell und kostengünstig untersucht werden. Sie erlaubt Rückschlüsse auf die Proteinsequenz und erste Strukturvorhersagen und bietet viele weitere Möglichkeiten.

Denkbare Anwendungsmöglichkeiten für das Surface Display sind beispielsweise die Produktion von variablen Ketten von Immunglobulinen mit verschiedenster Spezifität, die Präsentation von Rezeptoren oder Liganden zur Durchführung von Bindungsstudien, die Herstellung antigener Determinanten zur Entwicklung von Vakzinen oder die Erzeugung von Peptidbibliotheken zum Epitopmapping und für Antikörperspezifitätstests (Vaughan *et al.*, 1996; Maurer *et al.*, 1997). Mitte der achtziger Jahre wurde das „Phage Display“ entwickelt (Smith, 1985). Das Gen, das für das Protein von Interesse kodiert, wird mit dem verkürzten Gen des Hüllproteins pIII des M13-Phagen fusioniert und in *E. coli* eingebracht. Dort werden die Fusionsproteine gebildet und ins Periplasma transportiert, wo sie, nach Infektion mit einem M13-Helferphagen, von diesem in die virale Hülle eingebaut und präsentiert werden. Nach Ausschleusung des Phagen können die präsentierten Fragmente untersucht werden. Man kann die eingesetzte DNA so auswählen, dass theoretisch jeder Virus eine andere Proteinvariante trägt und optimierte Varianten gefunden werden können. Die Methode findet beispielsweise beim Hochdurchsatzscreening auf der Suche nach neuen Antikörpern Verwendung (Rondot *et al.*, 2001). Die Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche lebender Zellen hat gegenüber dem Phage Display Vorteile. Bakterien und Hefen sind im Gegensatz zu Bakteriophagen selbstreplikativ und ausreichend groß, um optischen Analysemethoden zugänglich zu sein. Bis heute sind zahlreiche Systeme auf der Basis von Hefen, grampositiven und gramnegativen Bakterien entwickelt worden (Lee *et al.*, 2003; Jose und Meyer, 2007).

4.3.2 Oberflächenexpression mit Hilfe von Autotransportern

Mit der Immunoglobulin A1 (IgA1) Protease aus *Neisseria gonorrhoeae* wurde in den achtziger Jahren das erste Mitglied der Autotransporterfamilie (Typ Va Sekretion) entdeckt und charakterisiert (Halter *et al.*, 1984; Meyer *et al.*, 1987; Pohlner *et al.*, 1987). Pohlner *et al.* (1987) entwickelten anhand der IgA1 Protease das erste Modell für einen möglichen Sekretionsmechanismus. Dabei befördert ein Signalpeptid das Vorläuferproteins in einen Mechanismus, welcher es über die innere Membran transportiert. Im Periplasma formt der C-terminale Teil des Proteins eine Porin ähnliche Pore in der Außenmembran. Die N-terminal gelegene Passagierdomäne wird über diese Pore auf die Oberfläche der Zellen geschleust.

Von Klauser *et al.* (1990) wurde das Signalpeptid und der Passagier des IgA1 Protease Autotransporterproteins durch die entsprechenden Domänen der im Periplasma von *V. cholerae* akkumulierenden β -Untereinheit des Cholera-toxins (CtxB) ersetzt. Das neu konstruierte Autotransporterkonstrukt konnte heterolog in *S. typhimurium* und in *E. coli* (Klauser *et al.*, 1992) exprimiert werden. CtxB wurde über die äußere Membran der Bakterien transportiert. Da der Metabolismus und die genetische Ausstattung von *E. coli* Bakterien weitestgehend erforscht sind, eignen sie sich besonders gut als Modellorganismus für das Surface Display rekombinanter Proteine (Blattner *et al.*, 1997). Die heterologe Expression von *Neisseria* Autotransportern in *E. coli* führte jedoch zu einer Beeinträchtigung der Zellen. Die Kultivierung in Flüssigmedien war nicht erfolgreich. Die bei der Durchmusterung einer Bibliothek mit Hilfe der Durchflusszytometrie aussortierten, positiven Varianten konnten sich nicht mehr teilen (Wentzel *et al.*, 1999).

Nach der Entdeckung der IgA1 Protease und ihres Sekretionsmechanismus wurden weitere Proteine identifiziert, die aufgrund ihrer gemeinsamen Strukturelemente der neuen Proteinfamilie der Autotransporter zugeordnet werden konnten (Jose *et al.*, 1995). Unter ihnen befand sich das AIDA-I Protein aus enteropathogenen *E. coli* Bakterien. AIDA-I wurde 1989 von Benz und Schmidt entdeckt. Da AIDA-I genuin in *E. coli* vorkommt, bot es die Möglichkeit zur Entwicklung eines Surface Display im homologen System.

4.3.3 Autodisplay als effektive Methode zur Oberflächenexpression

Um eine homologe Expression zu ermöglichen, wurde ein artifizielles Konstrukt entwickelt (Maurer *et al.*, 1997). Es bestand aus den C-terminalen Bereichen (Linker und β -Fass) aus AIDA-I aus *E. coli* und dem N-Terminus in Form des Signalpeptides und der Passagierdomäne der β -Untereinheit des Cholera-Toxins aus *V. cholerae*, welches bereits in früheren Studien mit dem IgA1 Protease β -Fass zum Erfolg führte (Klauser *et al.*, 1990).

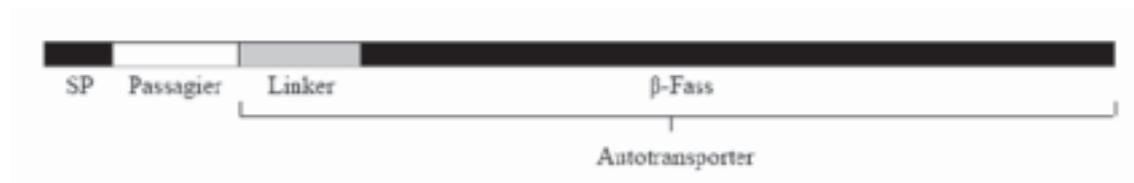


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Autotransporterproteins, wie es im Autodisplay System eingesetzt wird

SP=Signalpeptid aus *V. cholerae*; Passagierdomäne: im Falle des Autodisplay besetzt durch das Protein von Interesse; Linker- und β -Fassdomäne von AIDA-I aus *E. coli*.

Durch Einsetzen eines heterologen Passagiermoleküles an Stelle von CtxB wurde es möglich, auch andere Proteine auf der Oberfläche der Bakterienzellen zu präsentieren (Jose und Meyer, 2007). Der Mechanismus wird als Autodisplay bezeichnet (Maurer *et al.*, 1997).

Um einen Transport des Passagiermoleküls durch die β -Fass Struktur zu ermöglichen, ist es notwendig, eine Faltung im Periplasma zu verhindern (Jose *et al.*, 1996; Jose und Zangen, 2005). Gefaltete Passagierproteine könnten zu groß für den Transport durch die vom β -Fass gebildete Pore sein. Faltungen kommen beispielsweise zustande, wenn in einem Protein über die Verknüpfung von Cysteinen Disulfidbrücken entstehen können. Die periplasmatische Oxidoreduktase DsbA katalysiert die Bildung solcher Bindungen (Bardwell *et al.*, 1991). Mit JK321 wurde ein Stamm konstruiert, der unter anderem defizient für dieses Enzym ist (DsbA⁻) und damit die Ausbildung einer Tertiärstruktur verhindern kann (Jose *et al.*, 1996). Die Kulturbedingungen konnten durch den Zusatz reduzierender Agenzien, wie Mercaptoethanol oder Dithiothreitol, so verändert werden, dass die Ausbildung von Disulfidbrücken auch in DsbA⁺ Stämmen minimiert und ein Transport über die äußere Membran möglich wurde (Jose und Zangen, 2005). Das Autotransporterprotein enthält in dem nach außen präsentierten Linkeranteil Erken-

nungssequenzen für bestimmte Proteasen, wie beispielsweise Trypsin, Chymotrypsin und OmpT (Maurer *et al.*, 1997). Diese erlaubten es, die sezernierten und mit der Oberfläche verbundenen Passagiere selektiv abzuschneiden und in den Überstand zu entlassen. Damit ist es möglich, sezerniertes Protein und Zellen durch einen einfachen Zentrifugationsschritt voneinander zu trennen.

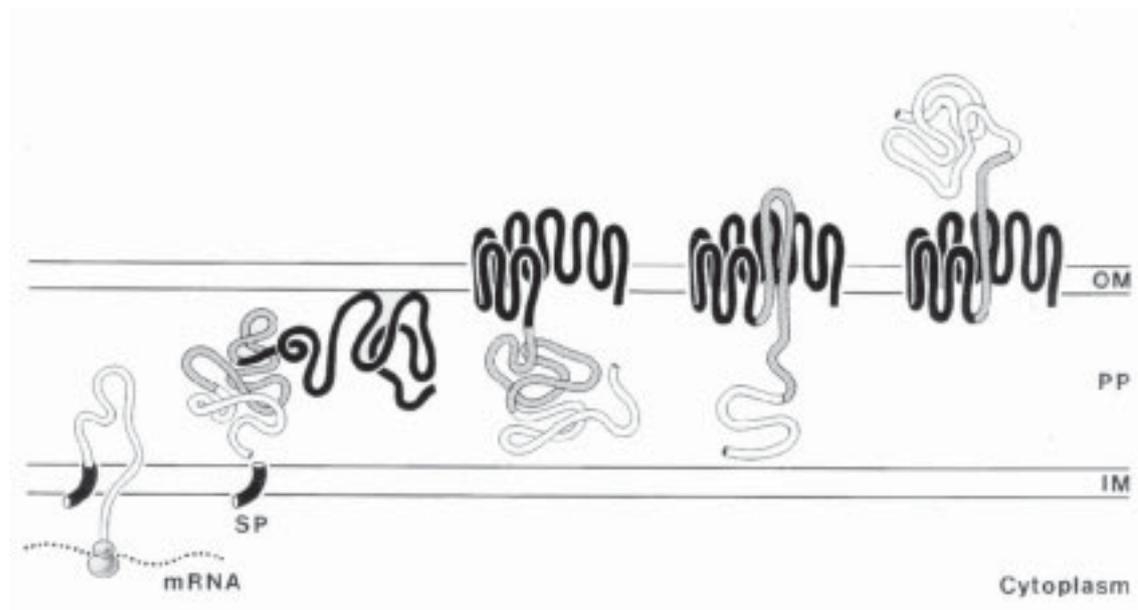


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Autodisplays

OM= outer membrane; IM= inner membrane; Das Vorläuferprotein wird am Ribosom translatiert und vermittelt durch sein N-terminales Signalpeptid in den Sec-Transportweg eingeschleust. Es gelangt nach Abspaltung des Signalpeptides ins Periplasma, wo sich die carboxyterminale Domäne spontan in die äußere Membran einlagert und eine fassähnliche Struktur ausbildet. Der Linker schleust sich durch die entstandene Pore aus, bildet eine so genannte Haarnadelstruktur aus und transportiert die Passagierdomäne nach außen. OM=Äußere Membran, IM=Innere Membran, PP=Periplasma

Durch den Einbau von Epitopsequenzen zwischen Passagier- und Linkerdomäne konnte das Protein spezifisch markiert und detektiert werden (Maurer *et al.*, 1997), z.B. im Western Blot. Ganze Zellen, die oberflächenständige Epitope tragen, konnten mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert und damit einer optischen Analyseverfahren wie der Durchflusszytometrie zugänglich gemacht werden (Jose *et al.*, 2002; Jose und von Schwichow, 2004a; Jose und Zangen, 2005). Um eine Markierung unabhängig von transportierten Passagieren und Epitopen zu ermöglichen, wurde ein Cystein in der Linkerdomäne eingeführt (Jose und Handel, 2003; Jose und von Schwichow, 2004b). *E. coli* Zellen tragen normalerweise keine frei zugänglichen Cysteine an der Oberfläche, so dass die Reaktion mit einem Maleinimid-Derivat zu einem stabilen thiolierten Ma-

leinimid spezifisch ist. Durch die Derivatisierung war es möglich, die nach außen transportierten Moleküle mit verschiedenen Markern zu koppeln (z.B. Fluoreszenzfarbstoff) und damit auch zu detektieren. Diese Methode wurde auf den Namen „Cystope-Tagging“ getauft und beim Autodisplay des Enzyms Sorbitdehydrogenase aus *R. sphaeroides* erfolgreich angewendet.

Die Esterase EstA aus *Burgholderia gladioli*, die artifizielle Esterase EsjA und die Sorbitdehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* konnten durch Autodisplay funktionell auf der Oberfläche der Bakterien präsentiert werden (Schultheiss *et al.*, 2002; Jose und von Schwichow, 2004a; Schultheiss *et al.*, 2008). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden Peptidbibliotheken von Enzyminhibitoren, deren Varianten mit Hilfe des Autodisplay präsentiert wurden, erfolgreich durchsucht und die Tauglichkeit des Systems zum High-Troughput-Screening erbracht (Jose *et al.*, 2005).

Das Autodisplay-System bietet Vorteile gegenüber anderen, konventionellen, zellulären Expressionssystemen. Im Gegensatz zu Phagen sind Bakterien selbstreplikativ und müssen sich zur Vermehrung keines Wirtsystems bedienen. Die Zahl der auf der Oberfläche präsentierten Proteine konnte mit Hilfe unterschiedlicher Methoden bestimmt werden. Die Menge an oberflächenständigem, bovinem Adrenodoxin (Adx) wurde durch einen Aktivitätsassay mit $1,5 \times 10^5$ Molekülen pro Zelle ermittelt (Jose *et al.*, 2001). Diese Zahl konnte durch „Cystope Tagging“ der an der Oberfläche präsentierten SDH aus *R. sphäroides* bestätigt werden ($1,8 \times 10^5$ Moleküle pro Zelle) (Jose und von Schwichow, 2004a). Sie übersteigt damit die anderer Oberflächenexpressionssysteme, wie zum Beispiel das Surface Display durch das Autotransporterprotein EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* in *E. coli* mit $8,1 \times 10^3$ Molekülen pro Zelle (Wilhelm *et al.*, 2007). Die oberflächenständigen Passagierproteine waren frei zugänglich für Substrate oder Bindungspartner, so dass auch nicht membrangängige Substrate in Ganzzellassays verwendet werden konnten (Schultheiss *et al.*, 2008). Die einzelnen β -Fässer, mit denen an ihnen verankerten Passagieren, waren in der äußeren Membran frei beweglich und erlaubten eine Multimerisierung, unter anderem nachgewiesen für die nur als Dimer vorliegende funktionelle Form der Sorbitdehydrogenase aus *R. sphaeroides* (Jose und von Schwichow, 2004a). Für das bovine Adrenodoxin konnte nicht nur eine Dimerisierung nachgewiesen werden, sondern auch die Aktivierung der biologischen Funktion durch Inkorporierung eines [2Fe-2S] Clusters (Jose *et al.*, 2002). Die Außen-

membranen der Bakterien, die mit Hilfe des Autodisplays Passagierproteine auf der Oberfläche präsentierten, waren stabil. Es konnte keine veränderte Integrität und ein damit einhergehender Austritt von periplasmatischen Proteinen festgestellt werden, wie sie bei anderen Fusionsproteinen auf der Basis von OmpA beobachtet worden waren (Georgiou *et al.*, 1996). Autodisplay bietet damit vielfältige Möglichkeiten für die Oberflächenexpression rekombinanter Proteine.

4.4 Erkenntnisse zu Struktur und Funktion der Transportdomänen von AIDA-I aus *E. coli*

Nachdem AIDA-I aus *E. coli* von Benz und Schmidt 1989 entdeckt worden war und von Jose *et al.* (1995) in die Familie der Autotransporter eingeordnet wurde, war es Gegenstand einiger Untersuchungen. Dabei konnten Erkenntnisse über Struktur und Funktion des Proteins und des Transportmechanismus gewonnen werden.

Benz und Schmidt (1992a) konnten nachweisen, dass zuerst ein Vorläuferprotein von AIDA-I gebildet wird. Dieser Vorläufer spaltete ein Signalpeptid ab. Das restliche Protein wird in das gereifte AIDA-I und einen weiteren, C-terminalen Teil prozessiert, dessen genaue Bedeutung zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war.

Nach einer Vorhersage der Sekundärstruktur durch Algorithmen und im direkten Vergleich zu strukturell verwandten Proteinen wie der IgA1 Protease aus *Neisseria*, wurde 1995 von Jose eine β -Fass Struktur für diesen Teil postuliert (Pohlner *et al.*, 1987; Jose *et al.*, 1995). Suhr *et al.* (1996) und Maurer *et al.* (1997) unterstützten diese Aussage mit eigenen Untersuchungen und wiesen nach, dass der β -Fass-Anteil in der Außenmembran der Bakterien lokalisiert ist. Artifizielle Konstrukte, in denen der N-Terminus einschließlich des nativen Passagiers AIDA-I ausgetauscht worden war, wurden ebenfalls in die Außenmembran transportiert und ihre Passagiere waren oberflächenständig. Der Austausch des ursprünglich 49 Aminosäuren langen Signalpeptides von AIDA-I gegen ein Signalpeptid von 21 Aminosäuren von CtxB aus *V. cholerae* beeinträchtigte den Transport des C-terminalen Teils nicht (Maurer *et al.*, 1997). Die Bildung einer stabilen β -Fass Struktur konnte erstmals durch unterschiedliche Methoden nachgewiesen werden (Suhr *et al.*, 1996; Maurer *et al.*, 1999; Konieczny *et al.*, 2001). Der Anteil von AIDA-I, der in die Außenmembran integriert war, wurde durch exogene oder endo-

gen oberflächenständige Proteasen nicht verdaut. Wie es auch schon für andere β -Fass-Proteine wie OmpA beschrieben wurde (Sugawara *et al.*, 1996), waren die Bindungen der Struktur so stabil, dass eine Denaturierung mit Detergenzien nur durch gleichzeitige Erhöhung der Temperatur auf über 70 °C möglich war. Im Fluorimeter konnte dabei eine starke Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, die eine Änderung der Umgebung der angeregten, aromatischen Aminosäuren anzeigt. Mit Hilfe von Circular Dichroismus Spektren wurde gezeigt, dass ein signifikanter Anteil der vorausgesagten β -Fass-Domäne aus β -Faltblättern besteht.

Maurer *et al.* (1999) konnten mit Hilfe von Deletionsmutanten nachweisen, dass alle β -Faltblätter des vorhergesagten β -Fasses (Jose *et al.*, 1995) essenziell für die Integration in die Außenmembran sind. Die minimale Länge des Linkers, die für eine Präsentation der Passagierdomäne auf der Oberfläche nötig ist, wurde dabei auf 47 Aminosäuren festgelegt. Konieczny *et al.* (2001) zeigten wenig später, dass eine Linkerlänge von 41 Aminosäuren zu einer Oberflächenpräsentation führt und kamen damit zu einem ähnlichen Ergebnis. In der Kristallstruktur der Autotransporters NalP und EspP fand sich im Innern des β -Fasses ein α -helikaler Linkeranteil (Oomen *et al.*, 2004; Barnard *et al.*, 2007). Mogensen *et al.* (2005) reinigten die C-terminale Domäne von AIDA-I aus zytosolischen Inclusion Bodies auf und falteten sie in einen nativen Zustand zurück. Übereinstimmend mit der Kristallstruktur wurde für das renaturierte Protein nach Vorhersage ein α -Helix-Anteil von 6% für die Sekundärstruktur angenommen. Bei Untersuchungen am Autotransporter BrkA aus *B. pertussis* wurde eine Domäne im N-terminalen Teil des Linkers identifiziert, die als eine Art Autochaperon für die korrekte Faltung dient (Oliver *et al.*, 2003). Diese Domäne war in anderen Autotransportern, wie AIDA-I, ebenfalls vorhanden (Konieczny *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 2004; Jose und Meyer, 2007). Sie scheint jedoch nicht notwendig für das Surface Display rekombinanter Passagiere mit Hilfe des Autodisplay-Systems (Maurer *et al.*, 1999; Jose *et al.*, 2005). Möglicherweise erhöht sie die Menge an oberflächenständigem Passagierprotein, insbesondere bei ungewöhnlich großen Autotransporterproteinen, indem sie den Transport und die nachfolgende Faltung unterstützt (Jose und Meyer, 2007).

4.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand von Sequenzanalysen der für die Transportdomänen des Autodisplay Systems kodierenden Gene geklärt werden, ob es im Laufe der Zeit zu einer Änderung der Aminosäuresequenzen gekommen war. Vorliegende Mutationen sollten in ihren ursprünglichen Zustand zurück versetzt werden und ihre Auswirkungen auf das Autodisplay hinsichtlich einer eventuellen Evolution im Labor überprüft werden. Die Änderungen in der Sequenz sollten mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese durchgeführt werden. Aus Untersuchungen an anderen Autotransporterproteinen wie PhoE aus *E. coli* und Pertactin aus *B. pertussis* war bekannt, dass es Schlüsselpositionen in der Aminosäuresequenz des Systems gibt, die unmittelbar Einfluss auf den Transport und die Integration nehmen. Von Interesse waren beispielsweise die Schnittstelle der Signalpeptidase als ein „Flaschenhals“ des Transportes über die innere Membran, sowie der C-Terminus der β -Fass Struktur in seiner Rolle als möglicher Vermittler der Integration und Faltung in die Außenmembran. Die dort befindlichen Aminosäuren sollten verändert und ein tieferer Einblick in den Autotransportermechanismus gewonnen werden. Das vorliegende Expressionsprotokoll sollte überprüft und so angepasst werden, dass es zu einer optimalen Präsentation eines Passagiers auf der Oberfläche der Bakterien führt.

5 Material

5.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit fanden verschiedene Bakterienstämme mit speziellen Eigenschaften für unterschiedliche Zwecke Verwendung. In den *E. coli* Stämmen UT5600, UT5600(DE3), JK321(DE3) und BL21(DE3), die sich schon früher als für das Autodisplay System geeignet erwiesen hatten, wurden die Expression und Integration der unterschiedlichen Autotransporterproteine untersucht. Mit Hilfe von DH5 α (DE3), der im Rahmen dieser Arbeit entstanden und nicht *ompT* defizient ist, wurde gezeigt, dass sich die Passagierdomänen an der Oberfläche mit einer bakterieneigenen Protease abspalten lassen.

Tabelle 1: in der Arbeit verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Literatur
UT5600	F ⁻ , ara-14, leuB6, secA6, lacY1, proC14, tsx-67, Δ (ompT-fepC)266, entA403, trpE38, rfbD1, rpsL109(StrR), xyl-5, mtl-1, thi-1	Grodberg und Dunn (1988)
UT5600(DE3)	F ⁻ , ara-14, leuB6, secA6, lacY1, proC14, tsx-67, Δ (ompT-fepC)266, entA403, trpE38, rfbD1, rpsL109(StrR), xyl-5, mtl-1, thi-1, λ (DE3)	Jose und Handel (2003)
JK321(DE3)	Δ ompT, proC, leu-6, trpE38, entA, zih12::Tn10, dsbA::kann	Jose und Handel (2003)
BL21(DE3)	B, F ⁻ , dcm, ompT, lon, hsdS(rB- mB-), gal, λ (DE3)	Novagen, Madison, USA
DH5 α (DE3)	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK ⁻ mK), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1, λ (DE3)	diese Arbeit
JM110	rpsL, (StrR), thr, leu, thi-1, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ (lac-proAB), [F ['] , traD36, proAB, lacIqZ Δ M15]	Sambrock et al. (1989)
TOP10	F ⁻ , mcrA, D(mrr – hsd, RMS – mcrBC) Φ 80 lacZ DM15, DlacX74, recA1, deoR, araD139, D(ara-leu) 7697 galU, galK, rpsL, (StrR) endA1 nup6	Invitrogen, Carlsbad, USA
XL-1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F ['] , proAB, lacIqZ Δ M15, Tn10 (TetR)]	Stratagene, Cedar Creek, USA

Der Stamm JM110, der defizient für die Methylase Dam ist, diente zur Gewinnung unmethylierter Plasmid-DNA, in der es möglich war, auch methylierungssensitive Schnittstellen wie die, die vom Restriktionsenzym *Xba* I geschnitten werden sollen, zu ver-

dauen. PCR-Amplifikat, welches „blunt-end“ in den käuflichen TOPO-TA-Vektor kloniert worden war, wurde in TOP10 Zellen transformiert. Mutierte und damit lineare DNA, die bei der Site-Directed-Mutagenesis anfiel, wurde in XL-1-Blue Zellen transformiert, die in der Lage sind die Plasmidstränge wieder miteinander zu verknüpfen.

5.2 Plasmide

Die Plasmide Autodisplay Domänen der Plasmide pJM007, pJM1013, pET-SH4 und pET-SH3 wurden einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen. Das Plasmid pET-SH3 diente als Ausgangssequenz für eine Reihe von unterschiedlichen Mutationen der C-terminalen Aminosäure. Es entstanden die Plasmide pEW003 (F485Y), pEW004 (F485H), pEW005 (F485*), pEW006 (F485W) und pEW008 (F485V). In pEW012 wurde das mutierte Codon, das in pET-SH3 für Aminosäure 21, eine Glutaminsäure, kodiert, gegen das ursprünglich vorkommende Codon, das für die Aminosäure Glycin kodiert, getauscht. In pETSH4rück sind vier Codons, die für die vier Aminosäuren des β -Fasses, die im Vergleich mit der ursprünglichen Sequenz von AIDA-I mutiert waren (K1008R-I1013R-R1210E-R1212S), wieder rückmutiert worden. Dieser rückmutierte Teil wurde in pET-SH3 kloniert: es entstand pEW010. Das Plasmid pEW007 entstand durch Klonierung der Transportdomänen aus pJM1013 in pET-SH3. In pEW009 wurden die Transportdomänen aus pET-SH3 in den Expressionsvektor pCOLA-Duet-1 kloniert. Aus der Arbeitsgruppe von Arne Skerra (TU München) erhielten wir das Helferplasmid pTUM4, das vier verschiedene Chaperone und Katalysatoren der Faltung überexprimiert. PCR-Fragmente, deren Enden geschnitten werden sollten, wurden in den käuflichen Vektor pCR-4-TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, USA) zwischenkloniert und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut.

Tabelle 2: Plasmide und Vektoren

Plasmid	Anmerkungen	Quelle
pJM007	Kodiert für eine Variante des Ausgangsproteins mit Passagier (CtxB), konstitutive Expression	Maurer <i>et al.</i> (1997)
pJM1013	Kodiert für eine Variante des Ausgangsproteins mit Passagier (PEYFK-Epitop), konstitutive Expression	Maurer <i>et al.</i> (1999)
pET-SH3	Kodiert für das Ausgangsprotein mit Passagier (PEYFK-Epitop), induzierbare Expression	Jose und Handel (2003)
pET-SH4	Kodiert für eine Variante des Ausgangsproteins mit Passagier (PEYFK-Epitop, Cystop), induzierbare Expression	Jose und Handel (2003)
pET-SH4rück	Kodiert für eine Variante des Ausgangsproteins mit Passagier (PEYFK-Epitop, Cystope), Sequenz des β -Fasses zur ursprünglichen AIDA-I-Sequenz rückmutiert, induzierbare Expression	zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe A. Scheidig, Strukturbiologie, Homburg
pEW003	Kodiert für die C-terminale Mutante F485Y, induzierbare Expression	diese Arbeit
pEW004	Kodiert für die C-terminale Mutante F485H, induzierbare Expression	diese Arbeit
pEW005	Kodiert für die C-terminale Mutante F485*, induzierbare Expression	diese Arbeit
pEW006	Kodiert für die C-terminale Mutante F485W, induzierbare Expression	diese Arbeit
pEW007	Kodierende Sequenz für das Ausgangsprotein aus pJM1013 in pETSH3 kloniert, induzierbare Expression	diese Arbeit
pEW008	Kodiert für die C-terminale Mutante F485V, induzierbare Expression	diese Arbeit
pEW009	Kodierende Sequenz für das Ausgangsprotein aus pETSH3 in pCOLA-Duet-1 kloniert, induzierbare Expression	diese Arbeit
pEW010	Kodiert für die Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S, induzierbare Expression	diese Arbeit
pEW012	Kodiert für die N-terminale Mutante E21G, induzierbare Expression	diese Arbeit
pTUM4	Überexpression von DsbA, DsbC, FkpA und SurA, konstitutive Expression	Schlapschy <i>et al.</i> 2006
pCOLA-Duet-1	Expressionsvektor + His-Tag, induzierbare Expression	Novagen, Madison, USA
pCR4-TOPO®	Vektor zur Zwischenklonierung bei der TOPO-TA-Klonierung	Invitrogen, Carlsbad, USA
pLysS	Helferplasmid, welches T7-Lysozym überexprimiert, konstitutive Expression	Invitrogen, Carlsbad, USA

5.3 Oligonukleotide

Die Synthese der Primer EW010 – EW024, FB001 und FB004 erfolgte durch die Firma SIGMA-ALDRICH (St. Louis, USA), die Synthese der Primer SH011 - SH024 durch die Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg).

Tabelle 3: verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Funktion	Sequenz
EW010	Forward-Primer, zur ortsgerichteten Mutagenese des F am C-Terminus in ein Y	GGGATAAAAATACAGCTACTGATAATGATCCGG
EW011	Reverse-Primer, zur ortsgerichteten Mutagenese des F am C-Terminus in ein Y	CCGGATCATTATCAGTAGCTGTATTTTATCCC
EW012	Sequenzierprimer für pJM007	CAGACGAGAGATGGTATTAAT
EW013	Sequenzierprimer für pJM007	GAATGGGGAAAATGCAACAG
EW014	Forward-Primer, zur ortsgerichteten Mutagenese des F am C-Terminus in ein H	GGGATAAAAATACAGCCACTGATAATGATCCGG
EW015	Reverse-Primer, zur ortsgerichteten Mutagenese des F am C-Terminus in ein H	CCGGATCATTATCAGTGGCTGTATTTTATCCC
EW018	Forward-Primer, zur ortsgerichteten Mutagenese des F am C-Terminus in ein Stop-codon	GGGATAAAAATACAGCTAGTGATAATGATCCGG
EW019	Reverse-Primer, zur ortsgerichteten Mutagenese des F am C-Terminus in ein Stop-codon	CCGGATCATTATCACTAGCTGTATTTTATCCC
EW020	Forward-Primer, zur ortsgerichteten Mutagenese des F am C-Terminus in ein W	CTGGGGATAAAAATACAGCTGGTGATAATGATCCGG
EW021	Reverse-Primer, zur ortsgerichteten Mutagenese des F am C-Terminus in ein W	CCGGATCATTATCACCAGCTGTATTTTATCCCCAG
EW022	Forward-Primer, zur ortsgerichteten Mutagenese des F am C-Terminus in ein V	GGGATAAAAATACAGCGTCTGATAATGATCCGG
EW023	Reverse-Primer, zur ortsgerichteten Mutagenese des F am C-Terminus in ein V	CCGGATCATTATCAGACGCTGTATTTTATCCC
SH015	Forward-Primer, zur Amplifizierung der Transportdomänen beginnend mit dem Signalpeptid aus pJM1013, pJM007, pET-SH3, Nco I-Schnittstelle angehängt	CCATGGTTAAATTA-AATTTGGTGTTTTTTTTACAG
EW024	Reverse-Primer, zur Amplifizierung des Signalpeptids aus pJM1013, Xba I-Schnittstelle angehängt	TCTAGAAGGTGTTCCATGTGCATATG
SH016	Reverse-Primer, zur Amplifizierung der Transportdomänen endend mit dem β -Fass, Bcl I-Schnittstelle angehängt	TGATCATTATCAGAAGCTGTATTTTATCCCC
FB004	Sequenzierprimer für das Signalpeptid von pETSH3 und allen Abkömmlingen, pETSH4, pETSH7	TATAGTCGACCCCAGTAGTAGGTTGAG
FB001	Sequenzierprimer für pET-SH3 und seine Abkömmlinge	AAAAATAGGCGTATCACGAGG
SH011	Sequenzierprimer für pJM007	CAGCATATGCACATGGAACACC
SH024	Sequenzierprimer für pET-SH3 und seine Abkömmlinge	CAGCATATGCACATGGAACACC
T3	Sequenzierprimer für die in den TOPO-TA-Vektor zwischenklonierten PCR-Fragmente	ATTAACCCTCACTAAAGGGA

Die Primerpaare EW010 und EW011 (F485Y), EW014 und EW015 (F485H), EW018 und EW019 (F485Stop), EW020 und EW021 (F485W) und EW022 und EW023 (F485V) dienen zur ortsgerichteten Mutagenese der C-terminalen Aminosäure des β -

Fasses. Mit Hilfe der Primer SH015, SH016 und EW024 wurden verschiedene Teile der Transportdomänen des Autodisplay amplifiziert und Schnittstellen angehängt, um sie in andere Konstrukte umzuklonieren. Die Plasmide pET-SH3, pET-SH4, pET-SH7 und deren Abkömmlinge wurden mit Hilfe der Primer FB004, FB001, SH024 sequenziert. Die Plasmide pJM007 und pJM1013 wurden mit Hilfe der Primer SH011, EW012 und EW013 sequenziert.

5.4 Enzyme

Folgende Enzyme wurden verwendet:

DNase I	Serva, Heidelberg
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Roth, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Karlsruhe Hybaid, Hilden
RNase A	Fermentas LIFE SCIENCES, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Karlsruhe
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf PCR Master Mix
SAWADY Pwo-DNA-Polymerase	PeqLab, Erlangen
Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Karlsruhe

5.5 Medien, Puffer und Lösungen

5.5.1 Medien

Zur Zellanzucht wurde Luria Bertani Broth (LB) verwendet (Sambrock *et al.*, Third Edition, 2001). Das Medium diente auch zur Herstellung von Agarplatten. Es wurde 16 g Agar-Agar pro Liter Medium eingesetzt. Zur Selektion plasmidhaltiger Zellen wurden

Antibiotika genutzt: Ampicillin (50 µg/ml oder 100 µg/ml), Chloramphenicol (30 µg/ml), Kanamycin (15 µg/ml) oder eine Mischung dieser Stoffe. Bakterienstämme, die cysteinhaltige Proteine transportieren, wurden unter reduzierenden Bedingungen (10 mM Mercaptoethanol) angezogen, um die Bildung von Disulfiden und damit eine Faltung oder Multimerisierung zu verhindern. Alle Nährmedien wurden im Autoklav Systec 3850 ELV bei 121 °C und 1,1 kg/cm² Druck für 20 Minuten sterilisiert.

Luria Bertani Broth 10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl
 16 g Agar-Agar (nur zur Herstellung
 von Platten)
 Reinstwasser ad 1000 ml
 pH 7,4 einstellen
 Autoklavieren

Antibiotikallösungen wurden sterilfiltriert und nach Abkühlung auf eine Temperatur von 60°C zugegeben (Platten) oder frisch in geeigneter Menge der jeweiligen Flüssigkultur zugesetzt.

Zur Äquilibration und Anzucht der Zellen nach einer Elektroporation wurde SOC-Medium genutzt (Sambrock *et al.*, Third Edition, 2001).

SOC 20 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 0,5 g NaCl
 10 ml KCl (250 mM)
 975 ml Reinstwasser
 pH 7,0 einstellen
 Autoklavieren, danach folgende Lösun-
 gen zugeben:
 20 ml Glucose (1M) sterilfiltriert
 5 ml MgCl₂ (2M) sterilfiltriert

Zur Langzeitlagerung der Bakterienstämme bei -72°C wurde PPM-Medium verwendet.

PPM Medium	15 g Bacto Proteose Pepton No. 3
	5 g NaCl
	1 g Stärke nach Zulkowsky
	1 g KH_2PO_4
	0,8 g K_2HPO_4
	232,5 ml Glycerin 86%
	Reinstwasser ad 1000 ml

5.5.2 Puffer und Lösungen

PBS 10X	80 g NaCl
	2 g KCl
	14,4 g Na_2HPO_4
	2,4 g KH_2PO_4
	pH 7,4 einstellen
	Reinstwasser ad 1000 ml

TBS 10x	80 g NaCl
	2 g KCl
	30 g Tris
	pH 7,4 mit HCl einstellen
	Reinstwasser ad 1000 ml

TE 10x	100 mM Tris/HCl pH 7,4
	10 mM EDTA pH 8,0
	pH 8,0 einstellen

Tris/HCl 1M	121,1 g Tris
	pH 7,4 mit HCl einstellen
	Reinstwasser ad 1000 ml

Lösungen zur Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly

L 1	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
L 2	0,2 M NaOH; 1 % SDS
L 3	60 ml 5 M Kaliumacetat; 11,5 ml Eisessig; 28,5 ml Reinstwasser; pH 4,8
TE-Puffer 1x	10 ml TE-Puffer 10x; 90 ml Reinstwasser
Ethanol 70%	

Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

TAE-Puffer 50x	2 M Tris, 0,05 M EDTA, 0,5 M Na-acetat, pH 7,8 mit Eisessig einstellen
Probenpuffer	1% SDS, 50% Glycerol, 0,02% Bromphenolblau
Färbelösung	1 µg/ml Ethidiumbromid in 1 l TAE 1x

Lösungen zur Isolierung der äußeren Membran von *E. coli*

0,2 M Tris/HCl	200 ml 1 M Tris/HCl, Reinstwasser ad 1000 ml, pH 8 mit HCl einstellen
Saccharose-Lösung	1 M Saccharose in Reinstwasser
EDTA-Lösung	10 mM EDTA in Reinstwasser
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym in Reinstwasser

PMFS-Lösung	100 mM PMSF in Isopropanol
Aprotinin	10 mg/ml Aprotinin in 10 mM HEPES pH 8
Extraktionspuffer	2% Triton X 100, 50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl ₂
DNase-Lösung	1mg/ml DNase I in Reinstwasser
N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium-Lösung	1% N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium in PBS 1x

Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2x Sample-Buffer	125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4% SDS, 2 mM EDTA, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerol
Acrylamidlösung	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid
Stacking-Gel-Buffer 4x	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4% SDS, 0,4% TEMED
Separating-Gel-Buffer 4x	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4% SDS, 0,4% TEMED
APS-Lösung	0,2 g Ammoniumperoxodisulfat in 1,8 ml Reinstwasser
5x SDS-Laufpuffer	15,1 g Tris, 94 g Glycin, 0,5% SDS in 1 l Reinstwasser
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1% SDS in 1 l Reinstwasser

Größenmarker zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes

Page Ruler Unstained Protein Ladder (Fermentas)	Referenzproteine bei 200, 150, 120, 100, 85, 70, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa
Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas)	Referenzproteine bei 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11 kDa

Prestained Protein Marker, Broad Range (NEB)	Referenzproteine: MBP- β -Galactosidase 175 kDa, MBP-Paramyosin 83 kDa, Glutamat Dehydrogenase 62 kDa, Aldolase 47,5 kDa, Triosephosphat-Isomerase 32,5 kDa, CBD-BmFKBP13 25 kDa, Lysozym 16,5 kDa, Aprotinin 6,5 kDa
--	---

Lösungen für die Färbung eines SDS-Gels

Färbelösung	2,5 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 450 ml Methanol, 450 ml Reinstwasser, 100 ml Eisessig
Entfärbelösung	10% Essigsäure

Lösungen für die Western Blot Analyse

Transferpuffer	25 mM Tris, 1,92 M Glycin, 200 ml Methanol, Reinstwasser ad 1000 ml
TBS 1x	100 ml TBS 10x, 900 ml Reinstwasser
Blockpuffer	TBS 1x, 3% BSA
Maus-Anti-PEYFK-AK-Lösung	1:35 verdünnt in 10 ml TBS 1x + 3% BSA, aus monoklonaler Maus Hybridoma Zelllinie Dü 142 [Maurer <i>et al.</i> , 1997]
Ziege-Anti-Maus-AK-Lösung	1 μ l Goat-Anti-Mouse-AK, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, (KPL, Gaithersburg, USA) in 10 ml TBS 1x + 3% BSA
Inkubationspuffer	100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 10 mM Tris pH 9,5, Reinstwasser ad 500 ml, pH auf 9,5 einstellen
BCIP-Stammlösung	0,5 g 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat in 10 ml DMF
NBT-Stammlösung	0,5 g Nitroblautetrazoliumchlorid in 10 ml DMF 70%
Färbelösung (Anti-Maus-AK)	10 ml Inkubationspuffer, 66 μ l NBT-Stammlösung, 33 μ l BCIP-Stammlösung

Lösungen für die FACS-Markierung

PBS 1x	100 ml PBS 10x, 900 ml Reinstwasser, sterilfiltrieren
Blockpuffer	PBS 1x, 3% BSA, sterilfiltrieren
Waschlösung	PBS 1x, 0,1% Tween 20, sterilfiltrieren
Maus-Anti-PEYFK-AK-Lösung	1:35 verdünnt in 10 ml PBS 1x + 3% BSA, aus monoklonaler Maus Hybridoma Zelllinie Dü 142 [Maurer et al., 1997]
Ziege-Anti-Maus-AK-Lösung	1 µl Goat-Anti-Mouse-Antikörper (KPL, Gaithersburg, Maryland) in 10 ml PBS 1x + 3% BSA

6 Methoden

6.1 Arbeiten mit Bakterien

6.1.1 Anzucht

Zur Kultivierung auf LB-Platten wurde von einer Platten- oder Stichtkultur mit einer sterilisierten Impföse ein Verdünnungsausstrich angefertigt oder steril eine Kugel der Dauerkultur aus der Stammhaltung auf die Platte gebracht und geschwenkt. Die Platten enthielten bei Stämmen ohne Plasmid kein Antibiotikum, bei Stämmen mit Plasmid abhängig von dem vom Bakterienstamm gebildeten Selektionsmarker 100 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol oder 15 µg/ml Kanamycin. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Übernackulturen wurden in 20 ml LB-Medium angesetzt und bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Zum Beimpfen wurde entweder eine Kolonie einer Plattenkultur, 1 Kugel einer Dauerkultur aus der Stammsammlung oder 2 µl einer Glycerolkultur verwendet. Enthielten die Stämme Plasmide, die als Selektionsmarker für eine oder mehrere Antibiotikaresistenzen kodierten, so wurden 100 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol oder 15 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

Hauptkulturen wurden mit 1/100 ihres Volumens an zweimal mit LB-Medium gewaschener Übernackultur inokuliert. Alle Kulturen wurden mit 10 mM Mercaptoethanol und abhängig vom im Stamm enthaltenen Plasmid mit Antibiotika versetzt und bei 37 °C und 200 rpm bis zur angestrebten optischen Dichte angezogen.

6.1.2 Stammhaltung

Plattenkulturen wurden wie unter 6.1.1 beschrieben beimpft und bis zu 2 Wochen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Zur Lagerung für mehr als 2 Wochen wurden die Zellen in Flüssigkultur wie unter 6.1.1 angezogen, 1 ml der Suspension abzentrifugiert und in 1 ml 20%igem Glycerol resuspendiert. Die Kulturen wurden bei – 20 °C im Gefrierschrank bis zu 6 Monaten gelagert.

Zur Dauerkultur wurde eine LB-Platte mit Bakterien beimpft und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die komplette Kultur wurde mit einem sterilen Wattestäbchen aufgenommen und in 2 ml PPM-Medium resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden gleichmäßig auf 2 sterile, mit Glaskügelchen befüllte Kryoröhrchen verteilt und in einem Ethanol-Trockeneisbad auf -70 °C schockgefroren. Die Röhrchen wurden zur dauerhaften Lagerung bei -70 °C in der Gefriertruhe aufbewahrt.

6.1.3 Bestimmung der optischen Dichte

Für einige Anwendungen ist es wichtig die Zellzahl der Kultur zu kennen. Die Bakterienzellen absorbieren und streuen Licht einer bestimmten Wellenlänge (578 nm). Über die Absorption lässt sich auf die optische Dichte (OD) und damit auf die Zellzahl rück schließen. Die Kultur wird mit LB-Medium 1:10 verdünnt, in Plastikkuvetten der Firma Brand pipettiert und die Absorption gegen LB-Medium bei 578 nm im Photometer gemessen.

6.1.4 Induktion der Proteinexpression

Standardmäßig wurden die Zellen einer Flüssigkultur bis zu einer optischen Dichte von 0,5 angezogen. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM Isopropylthiogalactosid bei 37 °C für eine Stunde induziert und durch eine fünfzehnminütige Lagerung bei 4 °C gestoppt.

6.1.5 Markierung von Bakterienzellen für die Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden fluoreszierende Partikel, in diesem Fall markierte Bakterienzellen, in einer Kapillare vereinzelt und mit einem Laser bestrahlt. Die dabei emittierte Fluoreszenz und ihr Streulicht werden von verschiedenen Detektoren an unterschiedlichen Messpunkten gemessen und geben Aufschlüsse über einige Zellparameter wie die durchschnittliche Fluoreszenz oder die Granularität. Über die elektrische Aufladung einzelner, an der Spitze der Kapillare austretender Tropfen ist es möglich, jede einzelne Zelle in unterschiedliche Reaktionsgefäße zu sortieren. Durch das in die Passagierdomäne integrierte Epitop (PEYFK) war es möglich, die Zellen, die den Passagier und damit auch das Epitop auf der Oberfläche tragen, mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff zu markieren.

Eine Übernachtskultur (20 ml Selektionsmedium) wurde mit einer Kolonie einer Plattenkultur (bzw. einer Kugel aus der Stammsammlung oder 5 µl einer Glycerinkultur) inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Die Hauptkultur (20 ml Selektionsmedium, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 1/100 ihres Volumens an Übernachtskultur (gewaschen) beimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,5 inkubiert. Stämme, deren Proteinexpression unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors standen, wurden auf Eis gestellt. Stämme, deren Proteinexpression unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors standen, wurden mit 1 mM Isopropylthiogalactosid für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm induziert. Die Induktion wurde durch fünfzehnminütige Lagerung auf Eis gestoppt und 1 ml der Suspension mit einer optischen Dichte von 0,6 entnommen. Alle nachfolgend verwendeten Lösungen wurden durch Sterilfiltration durch einen Filter mit der Porengröße 0,45 µm partikelfrei gemacht. Nachdem zweimal mit 500 µl PBS gewaschen worden war, wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine zehnminütige Inkubation mit 500 µl PBS + 3% BSA geblockt. Die sedimentierten Bakterien wurden in einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Antikörpers (1 µl AK in 34 µl PBS + 3% BSA) 30 Minuten belassen, dreimal mit 500 µl PBS + 3% BSA gewaschen und weitere 30 Minuten in einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Antikörpers (1 µl AK in 34 µl PBS + 3% BSA) inkubiert. Dieser Antikörper ist mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff (Dylight 647) gekoppelt. Dieser kann später zur Analyse im Durchflusszytometer (FACS) genutzt werden. Die markierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in soviel PBS resuspendiert, dass eine optische Dichte von 1 erhalten wurde. Gewöhnlich wurden 10000 Bakterien am gleichen Tag im Durchflusszytometer vermessen, als Negativkontrolle diente in den meisten Fällen eine genauso behandelte und markierte Probe, die aus Bakterien bestand, die kein Plasmid enthielten. Ein Ereignis der Messung entspricht einem fluoreszierenden Partikel. Dabei muss es sich nicht zwangsläufig um ein Bakterium handeln. Durch die Wahl eines geeigneten Schwellenwertes („Threshold“) wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, nur Bakterienzellen zu erfassen. Per Definition wurde festgelegt, dass ein Ereignis einer Zelle entsprach.

6.1.6 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien durch Elektroporation werden salzarme Zellsuspensionen benötigt, um einen Kurzschluss zu verhindern. Eine Übernachtskultur (25 ml LB-Medium) wurde mit einer Kolonie einer Plattenkultur inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Die Hauptkultur (500 ml vorgewärmtes YT-Medium) wurde mit der gesamten Übernachtskultur beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD), $\lambda=600$ nm) von 0,35 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf vorgekühlte Zentrifugenbecher verteilt und 20 Minuten unter gelegentlichem Schwenken auf Eis gelagert. Die Bakterien wurden bei 4 °C und 1000 x g für 10 Minuten in der Sorvall RC 5C Plus Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in 10 ml eiskaltem Reinstwasser resuspendiert. Alle Aliquots wurden vereinigt, mit eiskaltem Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 10 ml eiskaltem 10%igem Glycerol resuspendiert und mit derselben Lösung auf 100 ml aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendierung in 10 ml eiskaltem 10%igem Glycerol wurden die Bakterien 20 Minuten bei 4 °C und 1000 x g in der Hettich Universal 32 R Tischzentrifuge sedimentiert und vorsichtig in 1 ml eiskaltem 10%igem Glycerol gelöst. Die Zellzahl wurde durch Messung der OD bei 578 nm bestimmt und auf 2×10^8 Zellen/ml eingestellt. Die Suspension wurde in Aliquots von 50 μ l aufgeteilt, im Ethanol-Trockeneis-Bad schockgefroren und bei -70 °C in der Kühltruhe gelagert.

6.1.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Eine Übernachtskultur (25 ml LB-Medium) wurde mit einer Kolonie einer Plattenkultur inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Die Hauptkultur (LB-Medium) wurde mit einem Hundertstel ihres Volumens an Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden 30 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend in der Hettich Universal 32R Tischzentrifuge fünf Minuten bei 2500 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sedimente in jeweils 2,5 ml eiskalter 75 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Suspensionen werden mit 10 ml eiskalter 75 mM CaCl₂-Lösung versetzt, weitere 30 Minuten auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Die Sedimente wurden vereinigt und in 2,5 ml einer eiskalten 15%igen Glycerol-Lösung resuspendiert. Nach der Aliquotierung in Por-

tionen zu 200 μl wurden die Bakterien im Ethanol-Trockeneis-Bad schockgefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

6.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

6.2.1 Plasmidisolierung mit im Handel erhältlichen Kits

Plasmidisolierungen erfolgten mit dem Plasmid Miniprep Kit (Peqlab) und dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden). Es wurde eine Impföse einer Plattenkultur oder 2 ml einer Flüssigkultur eingesetzt. Die verwendeten Chemikalien und die Vorgehensweise können dem im Kit beiliegenden Beipackzettel entnommen werden.

6.2.2 Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly (modifiziert)

Eine Impföse einer LB-Platte oder 2 ml einer Flüssigkultur (Sediment) wurden in 300 μl L1 sorgfältig resuspendiert. Es wurde 300 μl L2 zugegeben, durch mehrmaliges Kippen gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung sollte danach fast klar sein. Nach Zugabe von 300 μl L3 und mehrmaligem Kippen des Reaktionsgefäßes wurde zehn Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an eiskaltem Isopropanol versetzt. Es wurde 30 Minuten in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand verworfen und 1 ml eiskalter 70%igem Ethanol zugegeben. Nach mehrmaligem, vorsichtigem Kippen wurde das Reaktionsgefäß in derselben Orientierung wie zuvor weitere zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment im Vakuumexsikkator getrocknet und in 20 μl Reinstwasser gelöst (Birnboim und Doly, 1979).

6.2.3 Restriktionsendonukleaseverdau

Restriktionsendonukleasen wurden von unterschiedlichen Herstellern bezogen, im häufigsten Fall jedoch von der Firma New England Biolabs (Karlsruhe). Die Zusammensetzung der Reaktionsgemische erfolgte auf Grundlage der vom Hersteller gegebenen Vorgaben. Verdaut wurde meist zwei Stunden im Heizblock bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, einzelne Enzyme oder Enzymgemische wurden auch kürzer oder länger inkubiert. Einige Enzyme

erlaubten einen Verdau in der Mikrowelle (z.B. BglII, NcoI, XbaI, XhoI) bei 600 Watt und über 40 Sekunden.

6.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden mit einem äquivalenten Volumen an 10 x Gelladepuffer versetzt. Das darin enthaltene EDTA bewirkt durch eine Komplexbildung zweiwertiger Ionen das Abstoppen eines Restriktionsendonukleaseverdau und das darin enthaltene Glycerol verändert die spezifische Dichte so, dass die Proben beim Auftrag in die Taschen des Gels absinken. Standardmäßig wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 und 1% Prozent verwendet. Waren die aufzutrennenden Fragmente sehr klein, wurde eine Konzentration von 1,5% Agarose eingesetzt. Es wurde mit einer Spannung von 120 V gearbeitet, die Laufstrecke variierte und richtete sich nach der Größe des aufzutrennenden Fragments.

6.2.5 Färbung von Agarose-Gelen

Die Agarose-Gele wurden zehn Minuten mit Ethidiumbromid (1 mg in 1l TAE-Puffer) gefärbt und unter fließendem Wasser entfärbt. Die Fluoreszenz des Ethidiumbromids wurde in einem Transilluminator durch UV-Licht der Wellenlänge 302 nm angeregt und mit Hilfe eines Videodokumentationssystems dokumentiert.

6.2.6 Gelextraktion

DNA-Fragmente von Interesse, die mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt worden waren, wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) extrahiert und mit 20 µl Reinstwasser eluiert. Die verwendeten Chemikalien und die Vorgehensweise können dem im Kit beiliegenden Beipackzettel entnommen werden.

6.2.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt.

6.2.7.1 Konzentrationsbestimmung im UV-Licht

Im Spektralphotometer wurde bei 254 nm die Absorption einer wässrigen DNA-Lösung gegen Reinstwasser vermessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine OD_{254} von 1 einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$.

6.2.7.2 Konzentrationsbestimmung über die Bandenvergleichsmethode

Es wurde ein DNA-Marker definierter Konzentration (λ -HindIII-Marker) mit den auszuwertenden Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen, aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im UV-Licht bei 302 nm ausgewertet. Es wurde die Leuchtintensität der Probe mit der der definierten Markerbanden verglichen und der Markerbande zugeordnet, die gleich intensiv aussah. Dann wurde nach folgender Formel die DNA-Menge [$\text{ng}/\mu\text{l}$] berechnet:

$$\frac{\text{Zugeordnete Bande (bp)} \times c(\text{Marker}) \text{ ng}/\mu\text{l} \times N}{\text{Genomgröße (Marker)} \times Z}$$

$N = \mu\text{l}$ aufgetragener Marker, $Z = \mu\text{l}$ aufgetragene DNA-Lösung

6.2.8 DNA-Fällung

Zur Aufkonzentrierung oder Aufreinigung einer DNA-Lösung wurden zwei Volumenanteile eiskalter Ethanol zugefügt und durch Kippen gut gemischt. Die Lösung wurde zur vollständigen Fällung 15-30 Minuten auf Eis inkubiert. Präzipitierte DNA wurde durch zehnmütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C sedimentiert, einmal mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in einem Volumen an Reinstwasser entsprechend der gewünschten Konzentration gelöst.

6.2.9 Denaturierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Um als Matrize für PCR-Reaktionen zu dienen, muss eine DNA einzelsträngig sein. Im Normalfall reicht die in jedem Zyklus der Reaktion durchgeführte Denaturierung bei 95 °C um die Doppelstränge zu trennen. In Einzelfällen ist es nötig, die DNA vorher chemisch zu denaturieren. 40 μl einer DNA-Lösung (ca. 2 μg doppelsträngige DNA)

wurden mit 10 µl einer 1 M NaOH-Lösung für fünfzehn Minuten bei 37 °C denaturiert. Es wurden 5 µl einer 5 M Natriumacetat und 150 µl eiskaltes Ethanol zugefügt, durch mehrmaliges Kippen gemischt und zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment einmal mit 150 µl 70%igem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die denaturierte DNA wurde in soviel Reinstwasser gelöst, dass sich eine Konzentration von 100 ng/µl ergab.

6.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion besitzt die Molekularbiologie ein vielseitiges Werkzeug. Es ist nicht nur möglich DNA zu vervielfältigen, sondern auch die amplifizierten Bereiche mit Restriktionsschnittstellen zu versehen. Damit gelingt es recht einfach, verschiedene Gene miteinander zu kombinieren und neue Fusionsprodukte zu schaffen. Standardmäßig wurde ein Protokoll benutzt (Tabelle 4) und an spezielle Bedingungen angepasst. Das Reaktionsgefäß wurde auf Eis gestellt und Reinstwasser vorgelegt. Primer, Template und Mastermix wurden zugefügt und der Ansatz in die vorgeheizte PCR-Maschine (Mastercycler gradient, Eppendorf) gestellt. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt und die Probe bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert oder bei –20 °C weggefroren.

Tabelle 4: Standardbedingungen für eine Polymerase-Ketten-Reaktion

Template	0,5 µl
Reinstwasser	12,5 µl
Primer forward 10 mM	1 µl
Primer reverse 10 mM	1 µl
Mastermix Eppendorf 2,5x	10 µl

1	Initiale Denaturierung	95°C	5 min.
2	Denaturierung	95°C	0,5 min.
3	Hybridisierung	50°C	0,5 min.
4	Elongation	72°C	1 min.
5	finale Elongation	72°C	2 min

6.2.11 Dephosphorylierung

Um die Rezirkulierung eines geschnittenen Vektors während der Ligation zu unterdrücken, wurden die Enden eines Fragmentes mit Hilfe der Antarktischen Phosphatase

(New England Biolabs) von ihren 5`ständigen Phosphatgruppen befreit. Die T4-DNA-Ligase benötigt zum Zusammenfügen zweier Fragmente mindestens ein Ende, das an dieser Stelle phosphoryliert ist. Besitzt der Vektor diese nicht mehr sondern nur das einzufügende Insert, so kann nur dann rezirkulierte DNA entstehen, wenn dephosphorylierter Vektor mit phosphoryliertem Insert verknüpft wird. Im Reaktionsansatz wurde verdauter Vektor mit 1 µl Antarktischer Phosphatase und Reaktionspuffer zu einem Volumen von 10 µl aufgefüllt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Antarktische Phosphatase wurde fünf Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert und der Reaktionsansatz entweder mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt oder sofort zur Ligation verwendet.

6.2.12 Ligation

Um neue Plasmide zu konstruieren, müssen mehrere DNA-Abschnitte, die alle nötigen Informationen enthalten, miteinander kombiniert werden. Dabei kann es sich um Teile eines bestehenden Plasmides oder auch um PCR-Produkte handeln. Diese Teile werden mit Hilfe von Restriktionendonukleasen so geschnitten, dass überlappende Enden entstehen. Die verschiedenen DNA-Fragmente wurden mit 1 µl T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Karlsruhe) und Reinstwasser zu einem Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt, wobei das Verhältnis von Insert zu Vektor meist zwischen 1:3 und 1:5 lag. Das Reaktionsgefäß wurde sofort in die vorgekühlte PCR-Maschine (Primus Cycler, Peqlab, Erlangen) gestellt und sechzehn Stunden bei 16 °C inkubiert. Die Ligase wurde zehn Minuten bei 65 °C inaktiviert, der Ansatz gegen Wasser dialysiert und transformiert.

6.2.13 Klonierung von PCR-Amplifikaten

Mit Hilfe der zur PCR verwendeten Primer wurden dem Amplikon 2 Schnittstellen angehängt, die es möglich machten, den amplifizierte Bereich in ein Vektorsystem einzufügen. Der PCR-Ansatz wurde zwei Stunden bei 37 °C mit den beiden Restriktionsenzymen, die eine Freisetzung der Schnittstellen ermöglichen, inkubiert. Die Enzyme wurden, wenn möglich, hitzeinaktiviert und mit dem ebenso geschnittenen Vektor ligiert. Führte diese Methode nicht zum Erfolg, wurde eine andere Strategie angewandt. Mit der oben beschriebenen Methode konnte nicht sichergestellt werden, dass die

Schnittstellen an beiden Seiten des Amplikons freigesetzt worden waren. Im TOPO TA[®] Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass die Taq-Polymerase an neu synthetisierte Stränge meist ein Adenosin anhängt. Der zur Verfügung gestellte Vektor pCR4[®]-TOPO[®] besitzt überhängende 3`-Thymidine und ist durch die kovalent gebundene Topoisomerase I so aktiviert, dass zum Einfügen des Amplikons keine Energie mehr benötigt wird. Das genaue Vorgehen kann dem Kit beiliegenden Manual entnommen werden. Das Amplikon kann nun mit den Restriktionsendonukleasen aus dem pCR4[®]-TOPO[®] Vektor herausgeschnitten werden.

6.2.14 Ortsgerichtete Mutagenese

Ein einfacher und effektiver Weg zum Austausch einer Aminosäure ist die Einführung einer Punktmutation durch ortsgerechte Mutagenese (Site-Directed Mutagenesis) auf DNA-Ebene. Diese Methode findet breite Anwendung, mehrere Kits sind auf dem Markt. Das Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene (Cedar Creek, USA) diente als Vorlage zur Entwicklung einer eigenen Methodik.

Es wurde für jede Mutation, die eingefügt werden sollte, ein komplementäres Primerpaar konstruiert, welches links und rechts der zu mutierenden Sequenz bindet und in seiner Mitte die gewünschte Punktmutation trägt. Die Primer wurden von der Firma SIGMA-ALDRICH (St. Louis, USA) synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt. Da doppelsträngige DNA als Matrize kein Amplifikat erbrachte, wurde sie, wie unter 6.2.9 beschrieben, vorher chemisch denaturiert.

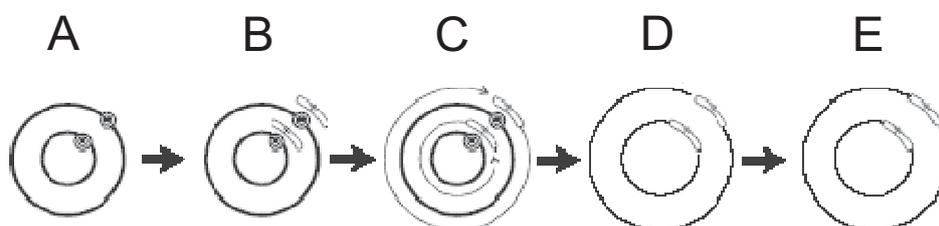


Abbildung 3: Schema der ortsgerechten Mutagenese nach QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene

(A) markiert ist das Gen im Plasmid, welches die Stelle enthält, die verändert werden soll, (B) Denaturierung der DNA und Annealing der Primer, die die gewünschte Mutation enthalten, (C) Verlängerung und Einbau der mutierten Primer zu offeneringförmigen Strängen, (D) Verdauung der methylierten, nicht mutierten Template-DNA mit Dpn I, (E) Transformation in XL1-Blue Zellen, die die offeneringförmigen Stränge reparieren und vermehren.

Reinstwasser, denaturierte Template-DNA, Primer und ein Polymerasengemisch wurden zusammenpipettiert und die Reaktion im PCR-Gerät (Mastercycler gradient, Eppendorf) gestartet. Um einen möglichst hohen Ertrag an Amplikon zu erhalten wurde ein Gemisch zweier verschiedener Polymerasen gewählt. Taq-Polymerase, welche im Mastermix (Eppendorf, Hamburg) enthalten ist, diente zur schnellen Amplifizierung und Pwo-Polymerase sollte mit ihrer Korrekturfunktion ein fehlerfreies Produkt gewährleisten. Da das zu vervielfältigende Plasmid 7 kb groß ist, verlängerte sich die Elongationszeit auf sieben Minuten. Die Schritte 2-4 der PCR-Reaktion wurden sechzehnmal wiederholt. 10 µl des Reaktionsgemisches wurden mit 1 µl DpnI bei 37 °C eine Stunde verdaut. Die Restriktionsendonuklease schneidet nur methylierte DNA. Das Amplifikat wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion hergestellt und ist daher nicht methyliert, im Gegensatz zur Template-DNA, welche aus Bakterien gewonnen worden war. Die Reaktion wurde durch eine zwanzigminütige Inkubation bei 80°C gestoppt und der Ansatz eine Stunde gegen Wasser entsalzt. 10 µl wurden in elektrokompetente XL-1-Blue-Zellen transformiert. Dieser Bakterienstamm nimmt lineare DNA auf und kann mit Hilfe einer Reparaturfunktion die ringförmige Form wiederherstellen. Die transformierten Bakterien wurden ausplattiert und einige Klone auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und die Sequenz ermittelt.

Tabelle 5: PCR-Bedingungen bei der ortsgerechten Mutagenese

Template	1 µl
Reinstwasser	26 µl
Primer forward 10 mM	1 µl
Primer reverse 10 mM	1 µl
Mastermix Eppendorf	20 µl
Pwo-Polymerase	0,5 µl

1	initiale Denaturierung	95°C	5 min.
2	Denaturierung	95°C	0,5 min.
3	Hybridisierung	60°C	1 min.
4	Elongation	72°C	7 min.
5	finale Elongation	72°C	10 min

6.2.15 Transformation elektrokompeter Zellen

Ein Aliquot elektrokompeter Zellen wurde aus der $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ Kühltruhe entnommen und zum Auftauen auf Eis gestellt. Die DNA-Lösung, die durch die Zellen aufgenommen werden sollte, wurde in eine adäquate Verdünnung ($<100\text{ ng}/\mu\text{l}$) gebracht und ebenfalls auf Eis gelagert. $1\text{ }\mu\text{l}$ der verdünnten Lösung wurde in die Zellsuspension pipettiert, vorsichtig gemischt und in den Reaktionsspalt (1 mm) einer Elektroporationsküvette eingebracht. Die Küvette wurde in den Elektroporator 2510 (Eppendorf, Hamburg) geschoben und die Zellen mindestens eine Millisekunde mit 1800 V geschockt, um die Membranen für die DNA durchgängig zu machen. Danach wurden die Bakterien sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 50 rpm äquilibriert. Die transformierten Zellen wurden in ausreichenden Verdünnungen auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ angezogen.

6.2.16 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen wurde aus der $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ Kühltruhe entnommen und zum Auftauen auf Eis gestellt. Nachdem höchstens 50 ng der zu transformierenden DNA zugegeben worden war, wurde die Suspension vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde für 90 Sekunden einem Hitzeschock in 42°C warmem Wasser ausgesetzt, $1\text{-}2\text{ Minuten}$ auf Eis gestellt und die Zellen sofort in $800\text{ }\mu\text{l}$ SOC-Medium aufgenommen. Nach einer 45-minütigen Äquilibration bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde ein entsprechend verdünntes Volumen auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ angezogen.

6.2.17 DNA-Sequenzanalyse

Zur Sequenzanalyse wurde die Plasmid-DNA einer Platten- oder Flüssigkultur mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) isoliert und dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum Düsseldorf (BMFZ) übergeben. Zur Sequenzierung fanden sowohl eigene wie auch Standardprimer des BMFZ Verwendung. Es wurden Geräte der Firma Applied Biosystems genutzt.

6.3 Arbeiten mit Proteinen

6.3.1 Außenmembranproteinpräparation

Um die Lokalisierung der Autotransporterproteine zu überprüfen, müssen die einzelnen Kompartimente der Bakterienzelle voneinander getrennt und die Außenmembranproteine angereichert werden. Nachdem kleinere Modifizierungen vorgenommen worden waren, fand die Methode nach Hantke (Hantke, 1981) Verwendung.

Eine Übernachtskultur (20 ml LB-Selektionsmedium) wurde mit einer Kolonie einer Plattenkultur inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Die Hauptkultur (Selektionsmedium, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 1/100 ihres Volumens an Übernachtskultur (gewaschen) inokuliert und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Stand die Translation unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors, wurden die Zellen jetzt abgeerntet. Stand die Translation unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors, wurde die Kultur in zwei gleiche Teile geteilt. Ein Teil blieb unbehandelt (Negativkontrolle) (Negativkontrolle), im anderen Teil wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM Isopropylthiogalactosid eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm induziert. Die Proben wurden fünfzehn Minuten bei 4 °C gelagert und die Zellen in der Sorvall RC 5C Plus Zentrifuge zehn Minuten bei 5000 rpm sedimentiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 1,5 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8 resuspendiert und nacheinander unter gelegentlichem Vortexen 0,1 ml 1 M Saccharose, 0,1 ml 10 mM EDTA, 0,1 ml Lysozym-Lösung (10 mg/ml) und 3,2 ml Reinstwasser zugefügt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben auf Eis gestellt und nacheinander unter gelegentlichem Vortexen 0,05 ml 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 0,01 ml einer Aprotininlösung (10 mg/ml), 5 ml Extraktionspuffer und 0,1 ml einer DNase I-Lösung (1 mg/ml) hinzu pipettiert. Die aufgeschlossenen Bakterien wurden 20-30 Minuten auf Eis inkubiert und die Zelltrümmer durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 4500 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde in neue Zentrifugenbecher überführt und die Zellmembranen durch eine zehnmütige Zentrifugation bei 18000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde durch kurzes Schwenken mit 5 ml einer 1% N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium-Lösung gewaschen, erneut zehn Minuten bei 18000 rpm sedimentiert und in 5 ml Reinstwasser resuspendiert. Nach einem weiteren zehnmütigen Zentrifugationsschritt

bei 18000 rpm wurde das pelletierte Material in 1 ml Reinstwasser aufgenommen und in der Hettich Universal 32 R Tischzentrifuge zehn Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert. Die Größe des Sedimentes wurde visuell abgeschätzt, die gleiche Menge Reinstwasser und die anderthalbfache Menge an 2 x Sample-Buffer hinzugefügt. Die Probe wurde weitgehend gelöst und zehn Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C oder – 20 °C im Kühl- bzw. Gefrierschrank.

6.3.2 Proteaseverdau ganzer Zellen

Zum Nachweis der Oberflächenständigkeit des Passagieranteils des Autotransporterproteins können verschiedene Methoden herangezogen werden. Ist ein Teil des Proteins nach außen gerichtet und damit nicht durch die Bakterienmembranen abgeschirmt, so kann er durch extrazellulär zugesetzte Proteasen abverdaut werden. Die Proteasen Proteinase K und Trypsin können die intakte Zellmembran nicht überqueren und haben Schnittstellen in den nach außen gerichteten Teilen des Proteins.

Eine Übernachtskultur (20 ml Selektionsmedium) wurde mit einer Kolonie beimpft und bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Die Hauptkultur (Selektionsmedium, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 1/100 ihres Volumens an Übernachtskultur versetzt und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,5 angezogen. Stand die Translation unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors, wurden die Zellen jetzt abgeerntet. Stand die Translation unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors, wurde die Kultur in zwei gleiche Teile geteilt. Ein Teil blieb unbehandelt (Negativkontrolle), im anderen Teil wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM Isopropylthiogalactosid eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm induziert. Die Induktion wurde durch eine fünfzehnminütige Inkubation bei 4 °C abgestoppt und die Zellen durch Zentrifugation (zehn Minuten bei 5000 rpm) in der Sorvall RC 5C Plus Zentrifuge abgeerntet. Die Sedimente wurden zweimal mit 5 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8 gewaschen.

Wurde die Probe mit Proteinase K verdaut, so wurden 12,5 µl einer Lösung (50 µg/ml) der Protease mit den in 5 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8 resuspendierten Bakterien gemischt und eine Stunde im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert.

Wurde die Probe mit Trypsin verdaut, fanden zwei unterschiedliche Protokolle Verwendung, die beide zum gewünschten Erfolg führten. Im ersten Fall wurden 50 µl einer

2,5%igen Lösung mit den in 5 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8 resuspendierten Zellen eine Stunde im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Im zweiten Fall wurden 150 µl einer 2,5%igen Lösung in 1 ml der Zellsuspension (in 0,2 M Tris/HCl pH 8) verdünnt, 30 Minuten auf Eis inkubiert, 10 µl einer 1 M CaCl₂ Lösung hinzu pipettiert und weitere 30 Minuten bei 37 °C verdaut.

Alle Verdaue wurden durch dreimaliges Waschen mit Tris/HCl + 10% FCS abgestoppt und die Membranisolierung wie unter 6.3.1 durchgeführt.

6.3.3 Fällung löslicher Proteine mit Trichloressigsäure

In einigen Fällen war es nötig, Proteine, die sich in Lösung befanden, zu fällen, um sie aufzukonzentrieren und mit Hilfe der SDS-PAGE aufzutrennen.

Zu der Lösung, in der sich die Proteine von Interesse befanden, wurde soviel 100%ige Trichloressigsäurelösung (500 g Trichloressigsäure (TCA) in 227 ml Reinstwasser gelöst) gegeben, dass sich eine TCA-Endkonzentration von 10% ergab. Die Fällung wurde durch eine dreißigminütige Inkubation bei 4 °C im Eis vervollständigt und die ausgefallten Proteine zehn Minuten bei 18000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal mit 5 ml Reinstwasser gewaschen und mit 2 x Sample-Buffer (reduzierend) unter Kochen in Lösung gebracht. Schlug der im Sample-Buffer enthaltene Indikator Bromphenolblau aufgrund von TCA-Rückständen nach gelb um, wurde solange mit Natronlauge alkalisiert und aufgekocht bis die Probe eine blaue Farbe annahm.

6.3.4 Hitzedenaturierung höherer Strukturen bakterieller Proteine

Von bakteriellen Tertiärstrukturen wie dem β-Fass, das sich aus β-Faltblättern zusammensetzt, ist bekannt, dass für ihre Denaturierung durch Hitze höhere Temperaturen benötigt werden als bei anderen strukturellen Elementen (Heller, 1978).

Die Außenmembranen des zu untersuchenden Bakterienstammes wurden wie unter 6.3.1 aufgereinigt und in reduzierendem Sample-Buffer gelöst. Je ein Teil wurde zehn Minuten bei 37 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C und 100 °C hitzedenaturiert, sofort auf Eis gestellt und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

6.3.5 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine binden das negativ geladene Detergens Sodiumdodecylsulfat (SDS) in stöchiometrischen Mengen. Dabei werden höhere Strukturen entfaltet, das Protein streckt sich und bildet mit dem Detergenz eine negativ geladene micellenartige Struktur. Die Auftrennung durch Elektrophorese erfolgt aufgrund des Molekulargewichtes, da die Eigenladung der Proteine überdeckt ist und damit vernachlässigt werden kann.

Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese bilden Acrylamid und quervernetztes Bisacrylamid eine Matrix. Die Polymerisation wird durch den Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet. Die Porengröße und damit auch die Trennleistung des Gels kann gezielt durch die Menge an Acrylamid und Bisacrylamid gesteuert werden.

Nach Lämmli wurden unterschiedliche Puffersysteme verwendet, um die Trennschärfe zu steigern. Es wurden Gelelektrophoresen in vertikalen Flachbettgelen mit Sammel- und Trenngel durchgeführt. Die Proteine wurden zuerst in einem Feldstärkegradienten fokussiert und aufkonzentriert, um dann nach ihrem Molekulargewicht getrennt zu werden. Es wurden je nach Anwendung 10 oder 12,5%ige Gele verwendet. Die Auftrennung erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei 120 V in einer Miniprotean Tetra Cell Apparatur (Bio-Rad, München), die Trennstrecke variierte, meist wurde gestoppt nachdem die Bromphenolblau Front fünfzehn Minuten aus dem Gel gelaufen war.

6.3.6 Färbung von SDS-Gelen

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel in einer Lösung von Coomassie Brilliantblau R-250 15-30 Minuten unter Schütteln gefärbt. Der Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Proteine an und kann nur schwer wieder entfernt werden. Der Hintergrund der Gele wurde durch Schütteln in 10%iger Essigsäure über Nacht entfärbt. Durch mehrmaliges zehnssekündiges Erhitzen in der Mikrowelle im Defrost-Modus kann dieser Vorgang beschleunigt werden. Die Gele wurden auf einen Transilluminator gelegt und mit einem Videodokumentationssystem dokumentiert.

6.3.7 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blot Verfahrens werden Proteine von einem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine hydrophobe Membran übertragen und immobilisiert.

Es wurde die Methode des Tank- oder Wet-Blot in der Miniprotein Tetra Cell Apparatur (Bio-Rad) angewendet. Ein der Größe des Gels entsprechendes Stück der hydrophoben PVDF-Membran wurde eine Minute mit Methanol benetzt und zehn Minuten in eiskaltem Transferpuffer eingelegt. Das SDS-Gel, das Filterpapier und die Fiber-Pads wurden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Auf die Kathode der Apparatur wurde ein Fiber-Pad, ein Filterpapier und das Gel gelegt. Die Membran wurde luftblasenfrei aufgelegt, ein weiteres Filter-Paper und Fiber-Pad und die Anode platziert. Die komplette Apparatur wurde mit eiskaltem Transferpuffer gefüllt, ein Kühlakku eingelegt und in eine Eisbox gestellt. Zur Übertragung der Proteine wurde eine Spannung von 100 V für eine Stunde angelegt. Die Membran wurde mit einer Pinzette entfernt und über Nacht die unspezifischen Bindungsstellen mit TBS pH 7,4 + 3% BSA geblockt.

6.3.8 Immunofärbung

Die transferierten Proteine sollten sichtbar gemacht werden. Fast alle untersuchten Konstrukte enthielten das PEYFK-Epitop, wodurch es möglich war, das Protein mit spezifischen Antikörpern zu koppeln.

Die über Nacht geblockte Membran wurde drei Stunden in einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörper (1:35 verdünnt in 10 ml TBS 1x + 3% BSA, aus monoklonaler Maus Hybridoma Zelllinie Dü 142) inkubiert, dreimal fünf Minuten mit TBS + 0,1% Tween 20 gewaschen und zwei Stunden in einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers (1 µl Goat-Anti-Mouse-AK in 10 ml TBS 1x + 3% BSA), der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS + 3% BSA und einmaligem Waschen mit TBS wurde ein Gemisch von 10 ml Inkubationspuffer, 66 µl einer Stammlösung von Nitroblautetrazoliumchlorid und 33 µl einer Stammlösung von 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat auf die Membran geschüttelt. Nach fünf bis zehn Minuten Inkubation im Dunkeln bildete sich an den Stellen, an denen der Antikörper gebunden hatte und damit das Enzym immobilisiert vorlag, ein rot-violettes Formazan.

6.3.9 Sequenzanalyse durch Edman-Abbau

Eine weitere Methode zur Aufklärung der N-terminalen Aminosäuresequenz von Proteinen ist der Edman-Abbau (Edman, 1949). Dabei wird die Peptidkette schrittweise abgebaut. Durch Zugabe von Phenylisothiocyanat im basischen Milieu wird die N-terminale Aminosäure des Peptids markiert. Es entsteht ein Phenylthiocarbamoylderivat. Unter schwach sauren Bedingungen wird die endständige Aminosäure als zyklisches Derivat abgespalten welches sich zu einem Phenylthiohydantoin (PTH) umlagert. Die restliche Peptidkette bleibt erhalten und kann weiter abgebaut werden. Mittels Chromatographie lassen sich nun die einzelnen PTH gekoppelten Aminosäuren nachweisen. Es gelingt Ketten von bis zu 30-40 Aminosäuren Länge zu sequenzieren.

Das Außenmembranisolat von Interesse wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Um die Probe nicht mit Glycin zu verunreinigen, fand ein spezieller glycinfreier Transferpuffer (10 mM CAPS, 10% Methanol) Verwendung. Die Banden wurden mit Ponceau S Lösung (0,2% Ponceau S, 1% Essigsäure) angefärbt, die Bande, die untersucht werden sollte, mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und zum Zentrum für Molekulare Medizin der Universität Köln (ZMMK) geschickt.

6.3.10 Sequenzanalyse durch Peptide-Mass-Fingerprinting

Ein weiteres Verfahren zur Bestimmung einer Peptidsequenz ist das Peptide-Mass-Fingerprinting. Das Protein von Interesse wird dabei tryptisch im Gel verdaut, die Fragmente chromatographisch aufgetrennt und per LC-MS-MS ihre Masse bestimmt.

Ein Außenmembranproteinisolat wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt. Die Bande von Interesse wurde ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß gebracht. Dieses wurde dem Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum (BMFZ) Düsseldorf zur Analyse übergeben.

6.4 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth

Albumin Fraktion V	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Ampicillin-Natrium	Roth
Aprotinin	Roth
Bromphenolblau	Acros
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma
Chloramphenicol	Roth
Coomassie Brilliant Blue	Serva
D (+)-Saccharose p.a.	Roth
Dodecylsulfat-Natrium (SDS)	Serva
Ethanol p.a.	Riedel-de Haën
Fetal Calf Serum (FCS)	BioWest
Glycerol p.a. wasserfrei	Roth
Glycerol reinst 86 %	Roth
Glycin p.a.	Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Applichem
Isopropanol p.a.	Fluka
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid	Fermentas
Kanamycinsulfat	Roth
Natriumchlorid	Merck
N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium	Sigma
Page Ruler Unstained Protein Ladder	Fermentas
PMSF	Sigma
Rotiphorese Gel 30 37, 5:1	Roth
Stärke, löslich nach Zulkowsky	Merck
TEMED	Roth
Tris	Sigma
Tris-HCl	Roth
Trypton/Pepton aus Casein	Roth

6.5 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer	Labnet	Electrophoresis Sub System 150
Autoklav	Systec	3850 ELV
Brutschrank	Memmert	-
Dokumentationssystem	Intas	-
Elektroporator	Eppendorf	2510
Feinwaage	Sartorius	2001 MP2

Magnetrührer	Ikamag	RCT
PCR-Geräte	Eppendorf	Mastercycler gradient
	MWG	Primus
pH-Meter	Knick	766 Calimatic
Photometer	Thermo	Genesys 6
Power-Supply	Biometra	Standard Power Pack P25
Schüttelinkubator	Infors	Minitron
SDS-Gelelektrophoresekammer	Biorad	Mini Protean 3
Thermoblock	Labnet	AccuBlock
Tischzentrifugen	Hettich	Mikro 120
		Universal 32R
Ultrazentrifuge	Thermo	Scientific RC5C Plus
Vortex-1 Genie Touch Mixer	Vortex	-
Wasseraufbereiter	Millipore	Biocell Milli-Q
Wasserbad	Memmert	-

7 Experimente und Ergebnisse

7.1 Evolution im Labor durch spontane Mutationen in den Transportdomänen des Autodisplay Systems

Wie beschrieben, besteht das dem Autodisplay zugrunde liegende Protein aus mehreren Teilen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Die für ein Protein codierende DNA-Sequenz ist durch spontane Mutationen einem Wandel unterworfen (Madigan *et al.*, 2000). Diese Veränderungen, sofern sie nicht stiller Natur sind, beeinflussen die Bakterienzelle mehr oder weniger stark. Es kommt zu unterschiedlich starken Abweichungen der Zelle gegenüber nicht oder anders mutierten Zellen. Diese Abweichungen können das Bakterium benachteiligen, was über einen längeren Zeitraum betrachtet sein Verschwinden zur Folge haben wird. Sie können aber auch einen evolutionären Vorteil bedeuten. In diesem Fall wird sich die Variante im Laufe der Vermehrungszyklen soweit behaupten, dass ihre Anzahl im Vergleich zur Gesamtzahl aller Varianten steigt. Es kommt zu einer so genannten positiven Selektion. Durch die erhebliche Wachstumsrate und das dadurch bestimmte Wechselspiel von Mutation und Selektion besitzen Bakterien also eine hohe Evolutions- und Adaptionsrate. Das befähigt sie schnell auf wechselnde Umwelteinflüsse zu reagieren (Cooper *et al.*, 2003). Durch Analyse verschiedener Bakterien und ihrer Eigenschaften kann es zur Selektion einer bestimmten Variante kommen, die für eine bestimmte Anwendung optimiert ist.

Es konnte vermutet werden, dass sich auch die Sequenzen der Transportdomänen des Autodisplay im Laufe der Zeit veränderten, möglicherweise hin zu einer optimierten Struktur. Die Modifikationen könnten das Bakterium befähigen, einem im Labor bestehenden Selektionsdruck zu begegnen und eine Variante zu etablieren, die verbesserte Eigenschaften aufweist.

7.1.1 Spontane Mutationen in den Transportdomänen des Autodisplay Systems

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von A. Scheidig, Strukturbiologie Kiel, soll der β -Fass Anteil des Autotransporters kristallisiert und röntgenkristallographisch unter-

sucht werden. Für diese Untersuchungen wurde ein Ausgangsprotein, mit einer möglichst kleinen Passagierdomäne in Form eines linearen Epitops (PEYFK) und einem zusätzlichen Cystein, ausgewählt. Durch Analyse der korrespondierenden DNA-Sequenz im Plasmid pET-SH4 konnte festgestellt werden, dass Unterschiede zu den in der Datenbank (Swiss Prot/TrEMBL) hinterlegten Sequenzen der Transportdomänen des Autodisplay Systems bestehen (Signalpeptid von CtxB: AccessionNr. P01556, Linker- und β -Fassbereiches aus AIDA-I: AccessionNr. Q03155). Es war zu mehreren Aminosäureaustauschen gekommen, die sich sowohl im Signalpeptid (2 Austausch), wie auch im Linker (1 Austausch)- und im β -Fass Bereich (4 Austausch) des Autotransporterproteins finden (**Tabelle 6**).

7.1.2 Mutationsanalyse der Transportdomänen weiterer Autodisplay Konstrukte

Die DNA-Sequenzen der Plasmide pJM007, pJM1013 und pET-SH3, die für die Transportdomänen des Autodisplay kodieren, wurden ebenfalls untersucht.

7.1.2.1 Spontane Mutationen in den Varianten des Ausgangsproteins, die durch die Plasmide pJM007 und pJM1013 kodiert werden

Die Plasmide pJM007 und pJM1013 wurden als eine der ersten auf AIDA-I basierenden Konstrukte, die Autodisplay ermöglichen, entwickelt (Maurer *et al.*, 1997; Maurer, 1998; Maurer *et al.*, 1999). Die Bildung der von ihnen kodierten Proteine steht unter der Kontrolle des konstitutiven P_K -Promotors (Klauser *et al.*, 1990). Die beiden Proteine sind in ihrem Aufbau recht ähnlich, unterscheiden sich jedoch in ihrem Passagier. Das durch pJM007 kodierte Protein enthält als Passagierdomäne CtxB, das durch pJM1013 kodierte Protein ein lineares Epitop (PEYFK). Das Mutationsmuster der aus der DNA-Sequenzierung ermittelten Aminosäuresequenz der beiden Konstrukte unterscheidet sich von den ursprünglich hinterlegten Sequenzen der Transportdomänen (**Tabelle 6**). Es kam zu drei Aminosäureaustauschen im β -Fass, einem Austausch im Linker und einem Austausch im Bereich des Signalpeptides, der jedoch nur in dem durch das Plasmid pJM1013 kodierten Protein aufgetreten war. Der Aminosäureaustausch im Signalpeptid erfolgte an Stelle 21, wo Glycin gegen Glutaminsäure ausgewechselt wurde. Die Schnittstelle der Signalpeptidase liegt nach Aminosäure 21, was sowohl mit einem Computeralgorithmus (GCG-Server, SPScan) voraus gesagt, wie auch experimentell

ermittelt wurde (Maurer, 1998). Wird an dieser Stelle nun der Tausch vorgenommen, führt dies nach Voraussage zu einem Wechsel der Schnittstelle von der Position nach Aminosäure 21 zu der Position nach Aminosäure 19.

7.1.2.2 Mutationen im Ausgangsprotein

Die Plasmide pET-SH3 und pET-SH4 wurden zu einem späteren Zeitpunkt auf Basis des Autotransporter-Fusionsgens aus pJM1013 konstruiert (Handel, 2003). Die Bildung des korrespondierenden Vorläuferproteins wird durch den induzierbaren T7/lac-Promotor gesteuert. Sie unterscheiden sich lediglich im Bereich der Domäne, die für den Einbau eines möglichen Passagiers vorgesehen ist. In pET-SH4 sind zum Zweck eines möglichen späteren „Cystope-Taggings“ (Jose und von Schwichow, 2004b) die Codons für ein Cystein und weitere Aminosäuren, welche aus der Klonierung stammen, eingefügt.

Tabelle 6: Aminosäuresequenz verschiedener Autotransporterproteine

		SIGNALPEPTID		LINKER AS 255	β-FASS			
		AS 2	AS 21		AS 1008	AS 1013	AS1210	AS1212
	CtxB / AIDA-I	I	G	A	K	I	R	R
pJM007	Ausgangsprotein mit CtxB als Passagier, konstitutive Expression	I	G	T	R	R	E	R
pJM1013	Ausgangsprotein, konstitutive Expression	I	E	T	R	R	E	R
pET-SH3	Ausgangsprotein, induzierbare Expression	V	E	T	R	R	E	S
pET-SH4	Ausgangsprotein mit einem zusätzlichen Cystein als Passagier, induzierbare Expression	V	E	T	R	R	E	S

Das durch pET-SH3 kodierte Protein diente in dieser Arbeit als Ausgangspunkt für die ortsspezifische Mutagenese und wurde deshalb im Folgenden als „Ausgangsprotein“ bezeichnet. Es konnte der Austausch verschiedener Aminosäuren, die sich sowohl im Signalpeptid (2 Austausch), wie auch im Linker (1 Austausch)- und im β-Fass Bereich (4 Austausch) finden, nachgewiesen werden (**Tabelle 6**). Es konnten keine Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen der Transportdomänen des Ausgangsproteins und seiner Variante mit einem zusätzlichen Cystein als Passagier gefunden wer-

den. Im direkten Vergleich zum Ausgangsprotein, dessen Bildung unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors steht, wurde durch die gewählte Klonierungsstrategie ein weiterer Austausch im Signalpeptid an Stelle Aminosäure 2 verursacht. Darüber hinaus kam es zum Austausch einer Aminosäure an Stelle 1212 des β -Fasses.

7.1.3 Einfluss von vier Aminosäureaustauschen im β -Fass auf das Auto-display eines linearen Epitops

Durch Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass sich die DNA-Sequenzen der Konstrukte an einigen Stellen unterscheiden. Besonders interessant sind die Austausche im Bereich des β -Fasses, da dieses einen großen Einfluss auf den Transport eines möglichen Passagierproteins über die äußere Membran hat.

Im Ausgangsprotein war es zu vier Aminosäureaustauschen im Bereich des β -Fasses gekommen (**Abbildung 4**). Aminosäure (AS) 1008 wurde von Lysin zu Arginin, AS 1013 von Isoleucin zu Arginin, AS 1210 von Arginin zu Glutaminsäure und AS 1212 von Arginin zu Serin getauscht. Wie schon länger bekannt, stellt man sich die Anordnung der Aminosäuren im β -Fass alternierend vor, so dass immer die hydrophilen Reste in die Pore zeigen, die hydrophoben Reste jedoch Kontakt mit den umgebenden Membranstrukturen aufnehmen können (Maurer *et al.*, 1997). Diese Anordnung ist nach dem Austausch auch weiterhin gegeben, außer an Stelle AS 1013, wo eine hydrophobe (Isoleucin) durch eine hydrophile (Arginin) Aminosäure ersetzt wird. An Position 1212 kommt es zum Austausch einer positiv geladenen Aminosäure (Arginin) durch eine polare, ungeladene Aminosäure (Serin).

Beim Transport von Außenmembranproteinen mit β -Fass Struktur von der inneren zur äußeren Membran wird die Bindung an verschiedene Proteine wie SurA diskutiert, die eine Chaperon- oder Transporterfunktion besitzen (Lazar und Kolter, 1996; Rouviere und Gross, 1996). Diese sollen gewährleisten, dass ihre Passagiere ungefaltet oder in der richtigen Konformation an ihren Integrationsort gelangen (Jose *et al.*, 1996; Gentle *et al.*, 2005) und dort gegebenenfalls an andere Proteine weitergegeben werden (Gentle *et al.*, 2005). Eine Änderung der Sequenz des β -Fasses könnte auf die Bindung Einfluss nehmen.

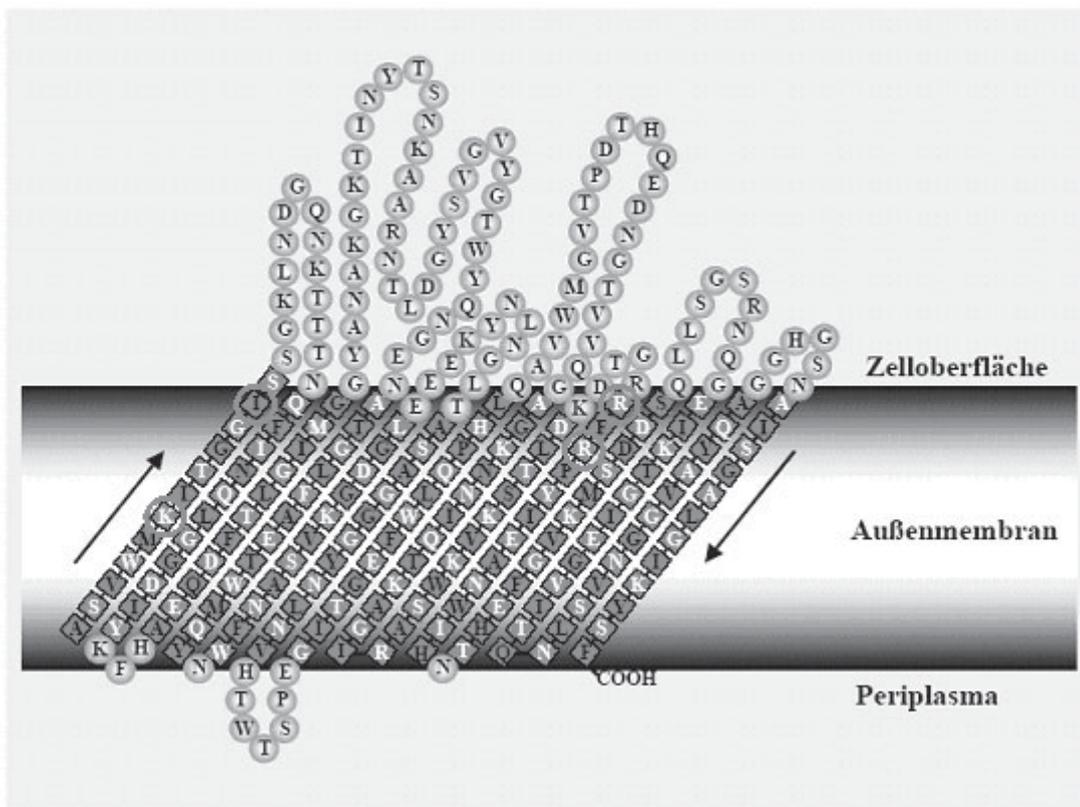


Abbildung 4: Model des β -Fasses

Alle Aminosäuren (AS) sind im Einbuchstabencode dargestellt. Runde Umrandungen markieren AS außerhalb der Membran, eckige AS innerhalb der Membran; gelbe Quadrate markieren hydrophobe, zur Fassaußenseite gerichtete AS, blaue Quadrate markieren hydrophile, zur Fassinnenseite gerichtete AS; mit Kreisen sind die im Ausgangsprotein mutierten Aminosäuren markiert.

Mit pET-SH4rück stand uns ein Konstrukt zur Verfügung, in dem mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese alle aufgetretenen Mutationen im β -Fass Bereich des Ausgangsproteins mit einem Epitop und Cystein als Passagier zur ursprünglich in SwissProt/TrEMBL hinterlegten Aminosäuresequenz des β -Fasses von AIDA-I rückmutiert worden waren. Das Plasmid wurde zur Verfügung gestellt von Mario Schu, Arbeitskreis A. Scheidig, Strukturbiologie Kiel. Um diesen Bereich in pET-SH3 zu klonieren, wurde die entsprechende Sequenz (1026 bp) aus dem Plasmid durch Verdau mit den Restriktionsenzymen RsrII und BamHI entfernt. Das Plasmid pETSH4rück wurde mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten, die Sequenz von 1026 bp durch Agarosegelelektrophorese abgetrennt, aufgereinigt und mit dem Fragment aus pET-SH3 ligiert. Es entstand das Plasmid pEW010, das für Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S kodiert.

7.1.3.1 Expression und Membranständigkeit der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S in *E. coli* UT5600(DE3)

Um die Expression und Membranständigkeit der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S zu überprüfen, wurde das Plasmid pEW010 durch Elektroporation in den Stamm *E. coli* UT5600(DE3) eingebracht. 20 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) wurde mit einer Kolonie der Bakterien inokuliert und unter Standardbedingungen angezogen. 800 µl dieser Kultur (gewaschen) wurde genutzt um 80 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) zu beimpfen. Die Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 angezogen und in zwei gleiche Hälften aufgeteilt. In einer Hälfte wurde die Proteinexpression mit 1 mM Isopropylthiogalactosid induziert, die andere Hälfte blieb unbehandelt (Negativkontrolle). Die Außenmembranproteine beider Proben nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert, in reduzierendem Probenpuffer gelöst und mit Hilfe der SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF Membran transferiert. Diese Membran wurde nach Standardprotokoll erst mit einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und danach mit einer Lösung des Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers inkubiert. Dieser zweite Antikörper ist mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt, die eine Substratlösung zu einem farbigen Produkt umsetzt. Als Vergleich dienten genauso behandelte *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3, *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH4 und *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH4rück.

In **Abbildung 5** ist in den Spuren 2, 4, 6 und 8 des Western Blots neben der prominenten Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa eine weitere deutliche Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa zu sehen. Das apparente Molekulargewicht von 53 kDa entsprach eher dem errechneten von 50 kDa. Daneben waren weitere Banden mit Molekulargewichten unter 53 kDa zu sehen. Dabei kann es sich um Abbauprodukte der unterschiedlichen Ausgangsproteine handeln, die jedoch noch das Epitop enthalten. Verglich man die Banden des Ausgangsproteins und seiner Variante mit Cystein als Passagier mit einem Molekulargewicht von 55 und 53 kDa mit denen der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S und seiner Variante mit zusätzlichem Cystein als Passagier, konnte kein relevanter Unterschied in der Intensität der Banden detektiert werden. In den Spuren 1, 3, 5 und 7 in **Abbildung 5** wurden die Proteine der Kulturen aufgetrennt, deren Proteinexpression nicht induziert worden war. In den Spuren 1 und 5 konnte eine dünne Bande mit einem apparenten Molekulargewicht

von 53 kDa detektiert werden. Diese Bande war auch in den Spuren 3 und 7 zu sehen, allerdings gelang es nicht, sie mit bildgebenden Verfahren hinreichend sichtbar zu machen. Das System ist unter den Bedingungen also „leaky“, eine Basalexpression ist gegeben.

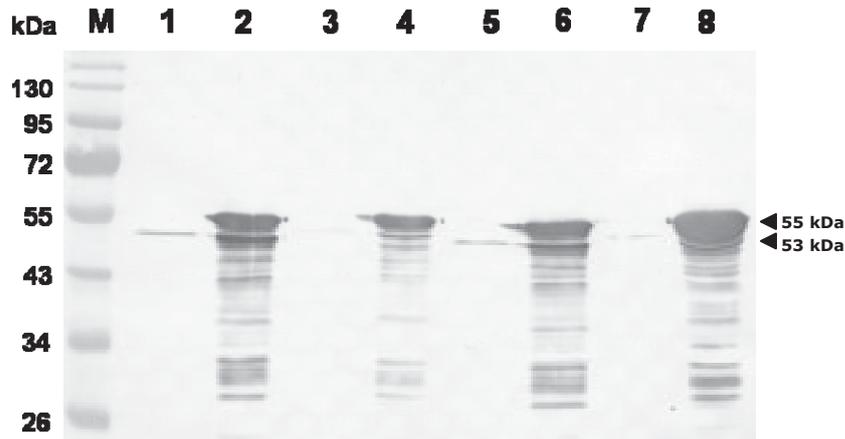


Abbildung 5: Expression und Membranständigkeit der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S. Die Zellen wurden angezogen, die Proben bei einer OD=0,5 geteilt und die Proteinexpression jeweils einer Hälfte mit 1 mM IPTG induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteinmischung, 1: Ausgangsprotein (F485), ohne IPTG; 2: Ausgangsprotein (F485), mit IPTG; 3: Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S mit einem zusätzlichen Cystein als Passagier, ohne IPTG; 4: Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S mit einem zusätzlichen Cystein als Passagier, mit IPTG; 5: Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S, ohne IPTG; 6: Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S, mit IPTG; 7: Ausgangsprotein mit einem zusätzlichen Cystein als Passagier, ohne IPTG; 8: Ausgangsprotein mit einem zusätzlichen Cystein als Passagier, mit IPTG.

Die vier veränderten Aminosäuren des β -Fasses hatten keinen merklichen Einfluss auf die Ausbildung der Proteine und die Membranständigkeit.

7.1.3.2 Oberflächenständigkeit eines Epitops als Passagier der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S in *E. coli* UT5600(DE3)

Nachdem die Membranständigkeit nachgewiesen war, musste geklärt werden, in welcher Orientierung zur Außenmembran sich die Passagierdomäne befindet. Prinzipiell sind zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen: die Orientierung in Richtung Periplasma (Talker-Huiber *et al.*, 2003) und die für das Autodisplay in der Vergangenheit nachgewiesene Orientierung nach außen (Maurer *et al.*, 1997; Schultheiss *et al.*, 2002). Im Fall

der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S bestand die Möglichkeit, das N-terminal vom Linker positionierte, lineare Epitop (PEYFK), wenn es oberflächenständig ist, mit Antikörpern zu markieren, die mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff (Dylight 647, Pierce, Rockford, USA) gekoppelt sind.

Die Hauptkultur (LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 200 µl einer Übernachtskultur (gewaschen) von *E. coli* UT5600(DE3)pEW010 beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 angezogen. Die Proteinexpression wurde induziert. Die Zellen wurden mit einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und dann mit einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers (gekoppelt mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff) behandelt. Die so markierten Proben wurden im Durchflusszytometer analysiert. Als Negativkontrolle diente *E. coli* UT5600(DE3), als Vergleich *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3, deren Proteinexpression auch induziert worden war.

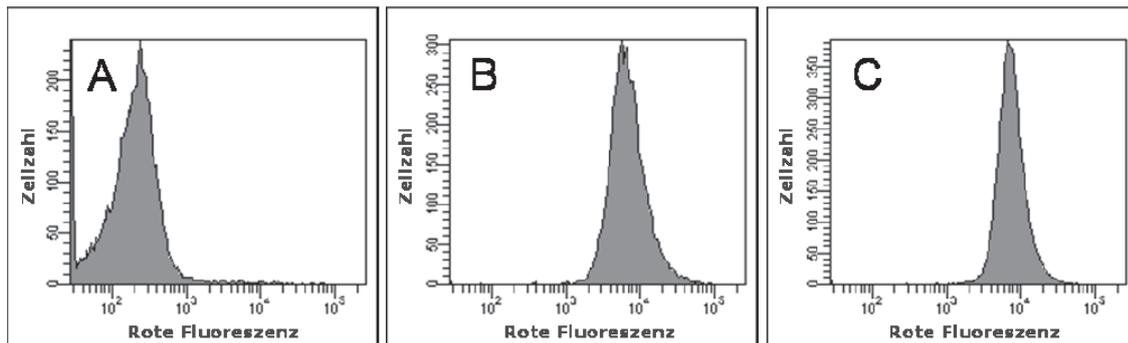


Abbildung 6: Oberflächenständigkeit eines Epitops als Passagierdomäne der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S in *E. coli* UT5600(DE3)

Die Bakterien wurden angezogen, die Proteinexpression induziert und das auf der Oberfläche präsentierte, lineare Epitop (PEYFK) mit einem Antikörper markiert, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt; A: UT5600(DE3) als Negativkontrolle, Fluoreszenzmittelwert: 512; B: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren, mF = 8289; C: Zellen, die die Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S exprimieren, mF = 8345.

Die Bakterien, die das Passagierepitop auf der Oberfläche tragen sollen (**Abbildung 6** B, C), zeigten eine deutliche Erhöhung der mittleren Fluoreszenz im Vergleich zu *E. coli* UT5600(DE3), die kein Autotransporterprotein bilden können (**Abbildung 6** A). Damit war nachgewiesen, dass die Epitope des Ausgangsproteins und der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S nach außen wiesen. Im Mittel unterschieden sich die

Fluoreszenzwerte von *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3, die das Ausgangsprotein exprimieren, und *E. coli* UT5600(DE3)pEW010, die die Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S exprimieren, jedoch nicht. Ein Austausch der vier mutierten Aminosäuren des β -Fasses des Ausgangsproteins durch die Aminosäuren der ursprünglichen Sequenz des β -Fasses von AIDA-I änderte die Zahl der markierbaren Epitope auf der äußeren Membran nicht. Die vier Aminosäuren (AS R1008K, R1013I, E1210R, S1212R) beeinflussten die Funktionalität des Proteins nicht, auch wenn sie wie im Fall von AS 1013 die alternierende Reihenfolge hydrophob/hydrophil unterbrechen oder an Stelle AS 1212 eine geladene gegen ein ungeladene Aminosäure getauscht wurde

7.1.4 Einfluss zweier verschiedener Signalpeptidaseschnittstellen auf das Autodisplay eines linearen Epitops

Nachdem der Einfluss der Mutationen im β -Fass untersucht worden war, war der nächste Schritt, auch den Bereich der mutierten Signalpeptidaseschnittstelle zu untersuchen. Die Signalpeptidase veranlasst die Freisetzung des Proteins aus dem Sec-Apparat nach dem Transport über die innere Membran (Sandkvist, 2001). Sie schneidet den Proteinstrang an Stellen, die eine bestimmte Aminosäurezusammensetzung aufweisen. Ausgehend von der Schnittstelle müssen sich kleine, neutrale Aminosäuren an den Positionen -1 und -3 befinden (von Heijne, 1983). Im Ausgangsprotein war es an der durch das Computerprogramm SPScan (GCG Wisconsin Package) vorhergesagten Stelle der Sequenz (A19-H20-G21), nach der die Signalpeptidase schneidet, zu einer Mutation gekommen (E21G). Die Position -1 verlor damit ihre Eigenschaften. Die Signalpeptidaseschnittstelle verschob sich laut Voraussage um 2 Aminosäuren nach vorne vor Aminosäure 19. Dort befand sich wieder eine Sequenz, die jeweils Alanin als kleine neutrale Aminosäure an Stelle -1 und -3 der vorhergesagten Schnittstelle aufwies (A17-Y18-A19). Um zu überprüfen, ob die veränderte Sequenz den Transport und die Prozessierung beeinflusste, sollte die Aminosäure an Stelle 21, eine Glutaminsäure, im Ausgangsprotein wieder in ihren ursprünglichen Zustand, ein Glycin, zurück mutiert werden.

Der Bereich der DNA-Sequenz von pJM007, bp 1-69, welcher das ursprüngliche Triplet, das für die Aminosäure Glycin an Stelle 21 codiert, enthielt, wurde mit Hilfe der Primer SH015 und EW024 amplifiziert. Primer SH015 hängt an das 5'-Ende des

Amplikons eine NcoI-Schnittstelle, Primer EW024 an das 3'-Ende eine XbaI Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) in den pCR4-TOPO Vektor zwischenkloniert. Dadurch wurde sichergestellt, dass die durch die Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen nach Verdau in ihrer geschnittenen Form vorliegen. Das im TOPO-Vektor zwischenklonierte PCR-Produkt wurde mit beiden Restriktionsenzymen unter Standardbedingungen verdaut, mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt. Das Plasmid pET-SH3, in welchem das Basentriplett geändert werden sollte, wurde zuerst durch Transformation in den *dam*⁻-Stamm JM110 eingebracht, um eine Methylierung der XbaI Schnittstelle zu verhindern, die einen Restriktionsverdau unmöglich machen würde. Dann wurde die nicht methylierte DNA isoliert und mit NcoI und XbaI geschnitten. Das 7031 bp große Fragment wurde aufgereinigt, dephosphoryliert und mit dem verdauten PCR-Produkt ligiert. Es entstand das Plasmid pEW012, das für Mutante E21G kodiert.

7.1.4.1 Expression und Membranständigkeit der Mutante E21G

Das Plasmid pEW012 wurde mittels Elektroporation in *E. coli* UT5600(DE3) eingebracht. Die Hauptkultur (80 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 800 µl der Übernachtskultur (gewaschen) beimpft, bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,5 inkubiert und aufgeteilt. In der einen Hälfte der Kultur wurde die Proteinexpression induziert, die andere blieb unbehandelt (Negativkontrolle). Die Außenmembranproteine beider Proben wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert. Mit Hilfe der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die so erhaltenen Isolate aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde zuerst mit einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und danach mit einer Lösung des Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers inkubiert. Nach Zugabe einer Substratlösung färbten sich die Proteine, die das Epitop trugen (PEYFK). Als Vergleich dienten genauso behandelte *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3.

Sowohl im SDS-Gel (**Abbildung 7 A**) wie auch im Western Blot (**Abbildung 7 B**) war in Spur 2 und 4 eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zu sehen. Direkt darunter befand sich eine zweite, schmälere Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa, was dem errechneten Molekulargewicht des Ausgangs-

proteins und der Mutante E21G nach Prozessierung durch die Signalpeptidase (50 kDa) eher entsprach.

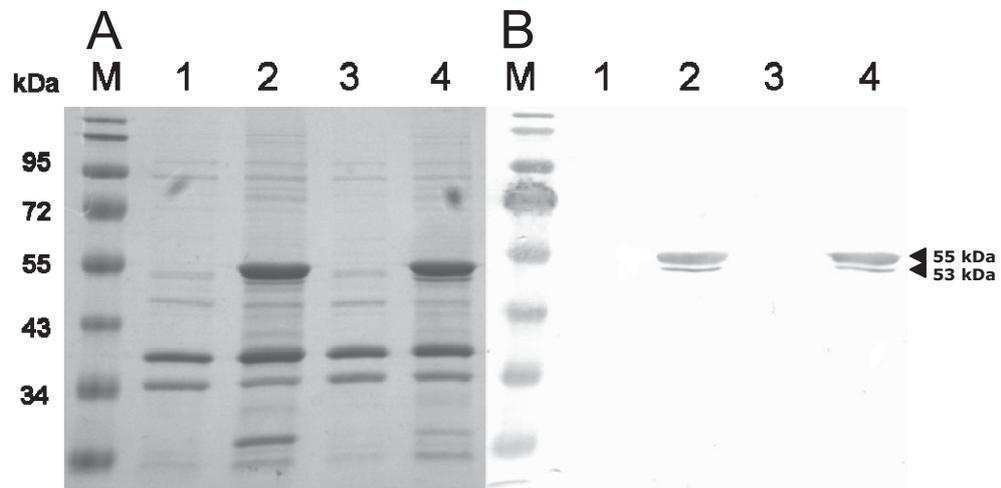


Abbildung 7: Expression und Membranständigkeit der Mutante E21G

Die Zellen wurden angezogen die Proben bei einer OD=0,5 geteilt und die Proteinexpression in jeweils einer Hälfte mit 1 mM IPTG induziert. Die Außenmembranen wurden isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden mittels Western Blotting auf eine Membran transferiert und das als Passagier in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch, 1: Mutante E21G, ohne IPTG; 2: Mutante E21G, mit IPTG; 3: Ausgangsprotein, ohne IPTG; 4: Ausgangsprotein, mit IPTG.

Die Banden des Ausgangsproteins unterschieden sich weder in Quantität noch in Qualität von den Banden der Mutante E21G. Die Mutation der Signalpeptidaseschnittstelle hatte keinen Einfluss auf den Transport und die Freisetzung von der inneren Membran. Die Ausbildung der beiden Banden wurde nicht beeinflusst.

7.1.4.2 Oberflächenständigkeit eines linearen Epitops als Passagier der Mutante E21G

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich das gesuchte Protein in der Außenmembranproteinfraktion befindet. Mittels Durchflusszytometrie (FACS) sollte seine Orientierung nach außen gezeigt werden. Mit 800 μ l einer Übernachtskultur von *E. coli* UT5600(DE3)pEW012 wurde die Hauptkultur (80 ml LB-Medium, 100 μ g/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) beimpft und angezogen. Nachdem die Proteinexpression induziert worden war, wurden die Zellen zuerst in einer Lösung eines Maus-Anti-

PEYFK-Primärantikörpers und danach mit einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper inkubiert, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff (Dylight 647, Pierce, Rockford, USA) gekoppelt ist. Die rot fluoreszierenden Bakterien wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) analysiert.

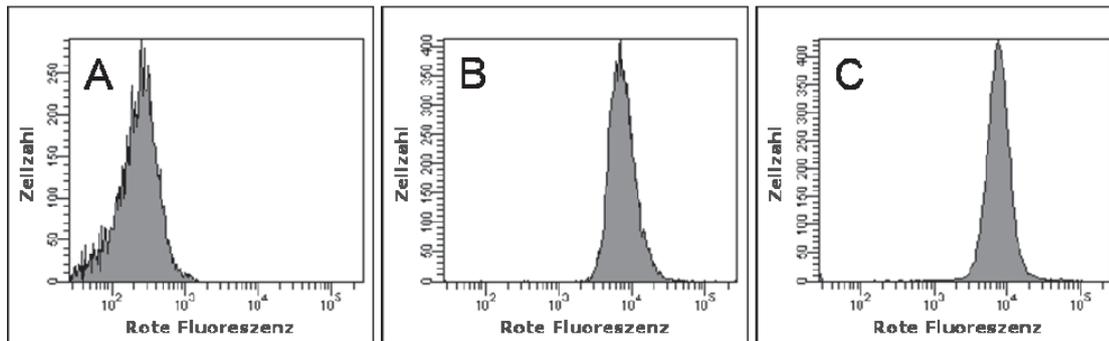


Abbildung 8: Oberflächenständigkeit eines linearen Epitops als Passagier der Mutante E21G

Die Bakterien wurden angezogen, die Proteinexpression induziert und das auf der Oberfläche präsentierte Epitop (PEYFK) mit einem Antikörper markiert, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt; A: UT5600(DE3) als Negativkontrolle, mF = 361; B: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren, mF = 8113; C: Zellen, die die Mutante E21G exprimieren, mF = 8104.

Die Bakterien, die markierbare Epitope auf der Oberfläche tragen können (**Abbildung 8** B, C), zeigten eine Verschiebung der mittleren Fluoreszenz um das zwanzigfache im Vergleich zu dem Stamm *E. coli* UT5600(DE3), der kein Expressionsplasmid enthielt (**Abbildung 8** A). *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3, die das Ausgangsprotein exprimierten, zeigten dabei keinen Unterschied im Fluoreszenzmittelwert zu *E. coli* UT5600(DE3)pEW012, die die Mutante E21G exprimierten. Die Rückmutation der Aminosäure 21 von Glutaminsäure zu Glycin hatte keinen Einfluss auf die Menge an oberflächenständigen Epitopen.

7.2 Einfluss verschiedener C-terminaler Aminosäuren auf die Integration und den Transport der Passagierdomäne des Ausgangsproteins

Um größeren Einblick in die Funktionsweise des Autodisplay Systems und der Autoporterproteine im Allgemeinen zu gewinnen, wurde ein Modellsystem gesucht. Der Stamm *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3 ist ein geeigneter Kandidat. Das Fusionsgen, das für die für den Transport benötigten Bereiche kodiert, setzt sich zusammen aus einer

Sequenz, die für das Signalpeptid von Cholera toxin B kodiert, einer Passagierinsertionsstelle und einem Bereich der für den Linker- und den β -Fassbereich aus AIDA-I kodiert. Das von diesem Bakterienstamm gebildete Protein hat einen möglichst kleinen Passagierbereich, bestehend aus einem linearen Epitop aus fünf Aminosäuren (PEYFK). Durch das Epitop besteht die Möglichkeit das Konstrukt auf Proteinebene nachzuweisen, sowohl in Außenmembranproteinisolaten, wie auch auf der Oberfläche ganzer Zellen. Mehrere Passagiere, wie beispielsweise die Sorbitdehydrogenase aus *R. sphaeroides* und die artifizielle Esterase EsjA, wurden in die Passagierinsertionsstelle eingefügt (Jose und Handel, 2003; Schultheiss *et al.*, 2008). Die mit Hilfe des Autodisplay präsentierten Enzyme konnten funktionell auf der Oberfläche nachgewiesen werden.

Aus diversen Alignments bakterieller Autotransporter war bekannt, dass als letzte Aminosäure am C-Terminus bakterieller Autotransporter vom Typ Va meist Phenylalanin vorliegt (Jose *et al.*, 1995; Henderson *et al.*, 1998). Liegt kein Phenylalanin vor, ist diese Stelle von Tryptophan besetzt. An Stelle 3, ausgehend vom C-Terminus, wird Tyrosin bevorzugt, an Stelle 5 eine weitere hydrophobe Aminosäure (Struyvé *et al.*, 1991). Die Rolle der Aminosäuren bei Membranintegration und Transport werden kontrovers diskutiert (Struyvé *et al.*, 1991; de Cock *et al.*, 1997; Hendrixson *et al.*, 1997). Am C-Terminus des Autodisplay Systems findet man, wie in einem Großteil der Autotransporter, eine hydrophobe, aromatische Aminosäure: Phenylalanin (Jose *et al.*, 1995; Henderson *et al.*, 1998). In einigen Autotransportern, beispielsweise Hap aus *H. influenzae* und Pertactin aus *B. pertussis*, ist diese Position von Tryptophan besetzt. Beide Aminosäuren nehmen strukturell dieselbe Stelle des Proteins ein und erfüllen damit auch ähnliche Funktionen. Der Austausch des C-terminalen Phenylalanins gegen Tryptophan sollte die Funktionalität des Proteins weniger beeinträchtigen als der Ersatz durch andere an dieser Stelle in der Natur nicht vorkommende Aminosäuren. In der Reihe der proteinogenen Aminosäuren existiert eine weitere aromatische Aminosäure: Tyrosin. Wird die Hydrophobizität der Aminosäuren nach der Skala nach Eisenberg eingeteilt, unterscheidet sich Tyrosin mit einem Wert von 0,26 deutlich von Phenylalanin (1,18) und Tryptophan (0,81) (Eisenberg, 1984). Es ist damit die aromatische Aminosäure mit dem niedrigsten Hydrophobizitätswert und könnte die Eigenschaften des C-Terminus verändern.

Tabelle 7: C-terminale Konsensussequenzen von Autotransporterproteinen aus gram-negativen Bakterien

Protein	Mikroorganismus	C-Terminus	Referenz
BrkA	<i>B. pertussis</i>	YRYSF	(Fernandez und Weiss, 1994)
Pertactin	<i>B. pertussis</i>	YRYSW	(Everest <i>et al.</i> , 1996)
AIDA-I	<i>E. coli</i>	IKYSF	(Benz und Schmidt, 1992b)
EspP	<i>E. coli</i>	FRYSF	(Brunder <i>et al.</i> , 1997)
EspC	<i>E. coli</i>	FRYSF	(Stein <i>et al.</i> , 1996)
Pet	<i>E. coli</i>	FRYSF	(Eslava <i>et al.</i> , 1998)
Tsh	<i>E. coli</i>	IRYSF	(Provence und Curtiss, 1994)
Antigen 43	<i>E. coli</i>	LNVTf	(Owen <i>et al.</i> , 1996)
Hap	<i>H. influenzae</i>	LGYRW	(Hendrixson <i>et al.</i> , 1997)
Hia	<i>H. influenzae</i>	VGYQW	(St Geme <i>et al.</i> , 1996)
Hsf	<i>H. influenzae</i>	VGYQW	(St Geme <i>et al.</i> , 1996)
VacA	<i>H. pylori</i>	MRYSF	(Schmitt und Haas, 1994)
IgA1 Protease	<i>N. gonorrhoeae</i>	IQIRF	(Pohlner <i>et al.</i> , 1987)
NalP	<i>N. meningitidis</i>	VGYRF	(van Ulsen <i>et al.</i> , 2001)
IcsA	<i>S. flexneri</i>	VKYTF	(Suzuki <i>et al.</i> , 1995)
Ssp	<i>S. marcescens</i>	LTWRF	(Miyazaki <i>et al.</i> , 1989)
IcsA/VirG	<i>S. sonnei</i>	VKYTF	(Yang <i>et al.</i> 2005)

Histidin besitzt aufgrund seiner speziellen strukturellen Beschaffenheit auch einen aromatischen Charakter. Es weist keinen aromatischen Benzolring oder andere davon abgeleitete Strukturen auf, sondern einen Imidazolring. Dieser Ring hat durch den eingebauten Stickstoff und sein freies Elektronenpaar 6 π Elektronen und gehört so nach der Hückelregel zur Gruppe der Aromaten. Histidin hat jedoch noch andere Eigenschaften, die es für die Untersuchung interessant machen. Im Gegensatz zu Phenylalanin und Tyrosin ist es basisch. Es ist die einzige proteinogene Aminosäure, die unter physiologischen Bedingungen sowohl als Protonenakzeptor wie auch als –donator fungieren kann. Die Aminosäure Valin wurde ausgewählt, da sie zwar nicht mehr aromatisch aber immer noch hydrophob ist und in der Hydrophobizitätsskala nach Eisenberg mit 1,08 einen ähnlichen Wert wie Phenylalanin (1,18) aufweist (Eisenberg, 1984). Dadurch wird der an anderer Stelle (Struyvé *et al.*, 1991) für wichtig erachtete Wechsel von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren nicht unterbrochen und auch der hydrophobe Charakter der letzten Aminosäure wird erhalten. Einzig die Aromatizität an letzter Stelle ist nicht mehr gegeben. Um die Reihe der Aminosäureaustausche am C-Terminus zu vervollständigen, sollte die C-terminale Aminosäure deletiert werden.

Wenn die letzte Aminosäure wirklich essenziell für die korrekte Präsentation des Proteins auf der Oberfläche ist, so sollte ihr Verschwinden Veränderungen am membranständigen Proteinteil nach sich ziehen.

7.2.1 Konstruktion der C-terminalen Mutanten des Ausgangsproteins mittels ortsgerichteter Mutagenese

Es sollten fünf verschiedene Mutanten konstruiert werden: F485W (kodiert durch pEW006), F485Y (kodiert durch pEW003), F485H (kodiert durch pEW004), F485V (kodiert durch pEW008) und F485* (kodiert durch pEW005), bei dem die letzte Aminosäure des β -Fasses deletiert wurde. Die Änderung der DNA-Sequenz wurde mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese durchgeführt. Für jede Mutante wurde ein komplementäres Primerpaar entworfen, welches links und rechts der zu mutierenden DNA-Sequenz bindet und in seiner Mitte die gewünschte Punktmutation trägt. Als Template für die PCR diente im Fall der Mutanten F485W, F485Y und F485V das Plasmid pET-SH3 (kodiert für das Ausgangsprotein mit einem F am C-Terminus), im Fall der Mutanten F485H und F485* das Plasmid pEW003 (kodiert für die Mutante F485Y)). Die Mutagenese wurde wie in 6.2.14 beschrieben durchgeführt und die Plasmide der Bakterienklone durch einen Doppelverdau mit NdeI und BamHI kontrolliert. Die DNA der überprüften Klone wurde mit Hilfe des Primers FB001, der „downstream“ des C-Terminus des β -Fasses an Stelle 1804 bp bindet, sequenziert. Alle kontrollierten Klone enthielten die erwartete Sequenz.

7.2.2 Nachweis der Deletion des C-terminalen Phenylalanins in der Mutante F485*

Um die Aminosäuresequenz eines Proteins zu bestimmen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Üblicherweise wird im Arbeitskreis eine indirekte Methode bevorzugt. Man bestimmt die DNA-Sequenz, was sehr schnell und kostengünstig vonstatten geht, und kann aus den aufeinander folgenden Triplets auf die dafür kodierenden Aminosäuren schließen. Um einen eindeutigen Nachweis für die Veränderung des C-Terminus zu erhalten, wurde die Aminosäuresequenz an dieser Stelle direkt untersucht. Dafür wurden die nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke isolierten Außenmembranproteine von Mutante F485* über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle diente das Ausgangsprotein (F485).

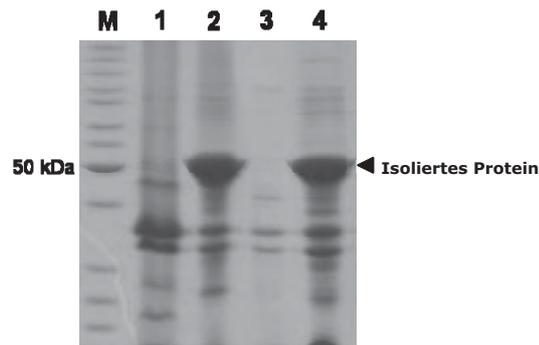


Abbildung 9: Auftrennung der Außenmembranproteine für die LC-MS mit Hilfe der SDS-PAGE

Die Außenmembranproteine wurden isoliert, mit Hilfe der SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch, 1: Ausgangsprotein, ohne IPTG; 2: Ausgangsprotein, mit IPTG; 3: Mutante F485*, ohne IPTG ; 4: Mutante F485*, mit IPTG.

In den Spuren 2 und 4 (**Abbildung 9**), in denen die Außenmembranproteine der Kulturen, deren Proteinexpression induziert worden war, aufgetrennt wurden, ist eine Bande der Größe von 50 kDa zu sehen. Unter diesen Bedingungen konnten die beiden unterschiedlichen Proteinformen mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 und 55 kDa nicht voneinander getrennt werden. Bei der untersuchten Bande handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Mischbande, die sich aus beiden Proteinformen zusammensetzt. Das Polyacrylamidgel wurde zur Analyse zum Biologisch-Medizinischem Forschungszentrum (BMFZ) gegeben. Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und mit Hilfe der Protease Trypsin im Gel verdaut. Über eine Größenausschlusschromatographie wurden die einzelnen Fragmente voneinander getrennt und mit Hilfe der Massenspektrometrie (MALDI-TOF) identifiziert.

Es konnten zwei verschiedene C-terminale Fragmente unterschieden werden. Das Ausgangsprotein trägt als C-terminale Aminosäure Phenylalanin. Es wurde in **Abbildung 10** ein Tripeptid der Sequenz YSF (416.21 m/z, Tyrosin-Serin-Phenylalanin) detektiert.

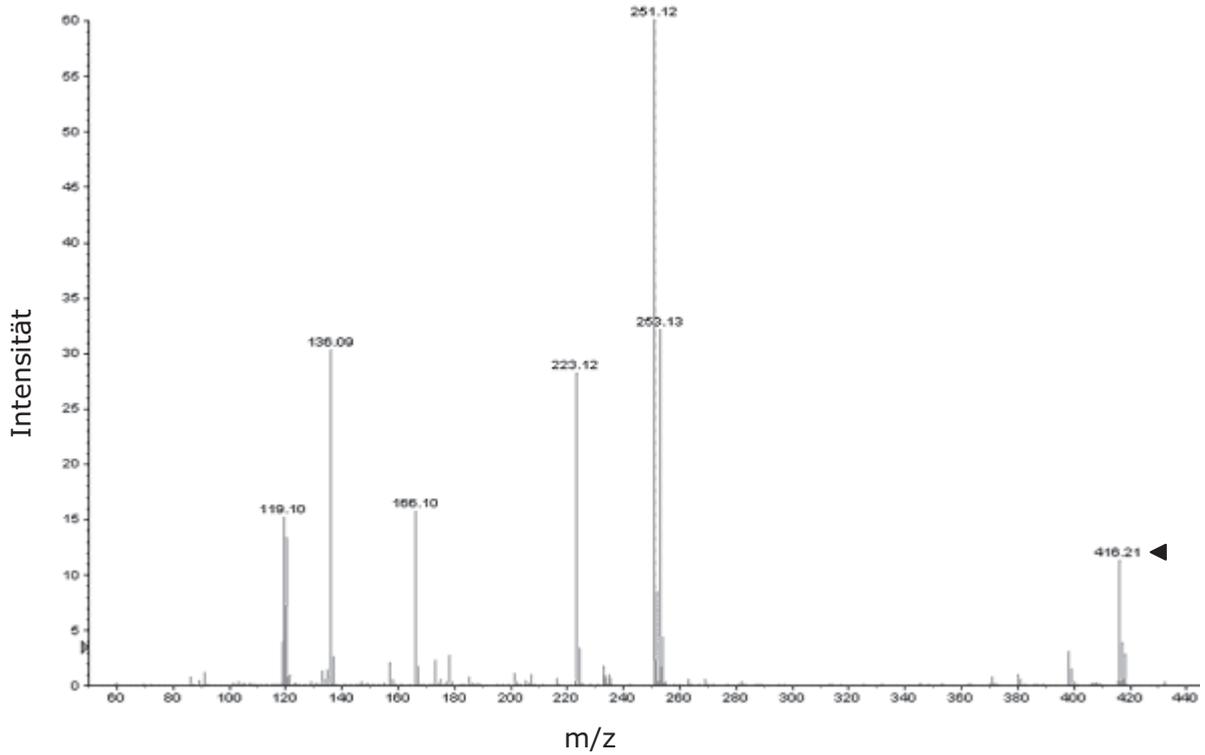


Abbildung 10: Massenspektrometrische Analyse des C-Terminus des Ausgangsproteins
TOF-Produkte des Ausgangsproteins von 60–440 m/z, gekennzeichnet ist das Produkt des Tripeptides aus Tyrosin, Serin und Phenylalanin (Y-S-F, 416.21 m/z)

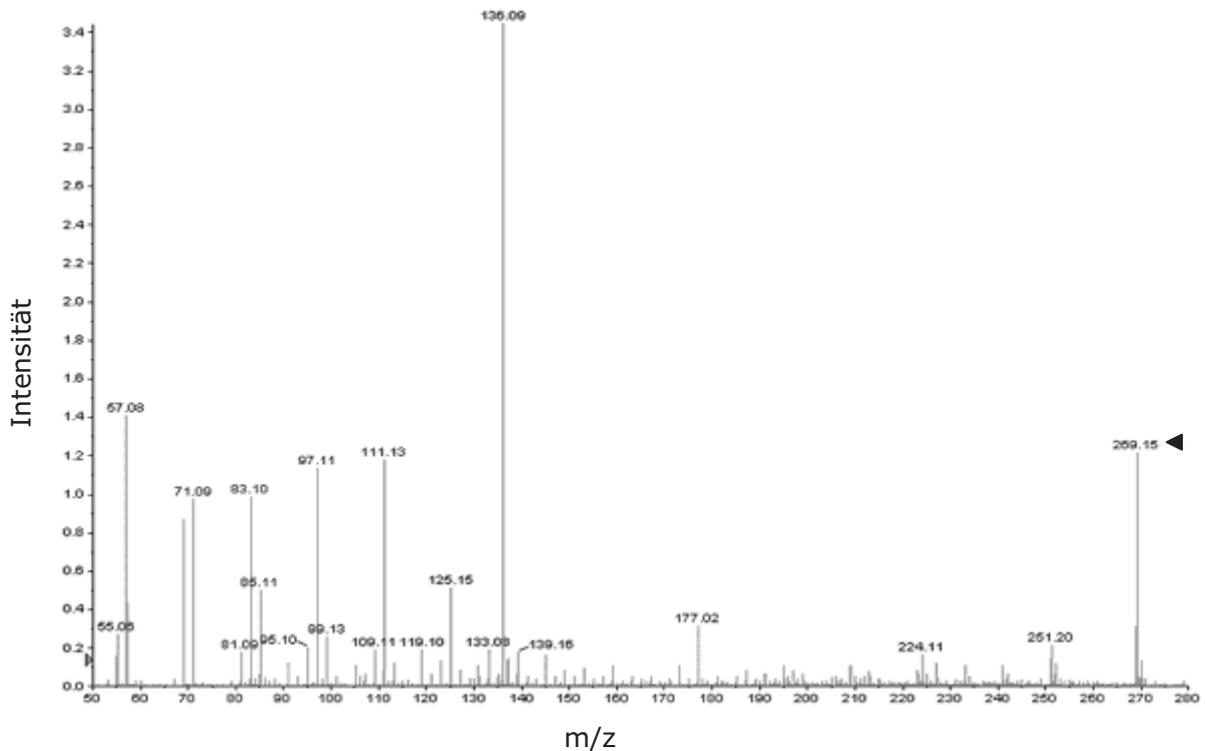


Abbildung 11: Massenspektrometrische Analyse des C-Terminus der Mutante F485*
TOF-Produkte der Mutante F485* von 50–290 m/z, gekennzeichnet ist das Produkt des Dipeptides aus Tyrosin und Serin (Y-S, 269.15 m/z)

7.2.3 Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in *E. coli* UT5600(DE3)

Die Plasmide, die für das Ausgangsprotein mit einem F am C-Terminus und seine Mutanten kodieren, wurden in elektrokompente *E. coli* UT5600(DE3) Zellen eingebracht. Diese Bakterien eignen sich besonders gut für die nachfolgenden Experimente, da sie eine Induktion der Proteinbildung ermöglichen und *ompT* defizient sind (Jose und Handel, 2003). Das Protein kann über einen definierten Zeitraum gebildet werden, so dass kein Selektionsnachteil für die Zellen entstehen sollte, und verbleibt auf der Oberfläche, wo es detektiert werden kann. Die Hauptkulturen (40 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurden mit 400 µl der Übernachtskulturen (gewaschen) von *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3, *E. coli* UT5600(DE3)pEW006, *E. coli* UT5600(DE3)pEW003, *E. coli* UT5600(DE3)pEW004, *E. coli* UT5600(DE3)pEW008 und *E. coli* UT5600(DE3)pEW005 inokuliert und bis zu einer OD von 0,5 angezogen. Die Proteinexpression der Bakterien wurde induziert und danach die Außenmembranproteine der Zellen nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert. Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und sowohl mit Coomassie Brilliantblau gefärbt, wie auch mit Hilfe des Western Blots auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde zuerst mit einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und dann mit einem Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper inkubiert. Nach Inkubation in einer Substratlösung konnten farbige Banden an den Stellen detektiert werden, wo der Antikörper an das Epitop gebunden hatte.

In den Spuren 1-6 des gefärbten SDS-Gels (**Abbildung 12 A**) und des Western Blots (**Abbildung 12B**) war eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zu sehen. Vergleich man die Menge der Proteine verschiedener Isolierungen im Mittel, so zeigten sich ähnliche Bandenstärken der oberen Bande beim Ausgangsprotein (Spur 1) und seinen C-terminalen Mutanten (Spur 2-5). Die Mutante F485* zeigte in dieser Darstellung eine verminderte Menge dieser Bande (Spur 6). Vergleich man jedoch verschiedene Isolierungen miteinander, so zeigte die Bande eine ähnliche Stärke wie bei allen anderen Mutanten. Im Western Blot (**Abbildung 12 B**) konnte noch eine zweite Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa detektiert werden, was dem errechneten Molekulargewicht des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten

(50 kDa) eher entsprach. Diese Bande war im SDS-Gel (Abbildung 12A) auch zu sehen, konnte jedoch durch die Videodokumentation nur schlecht dargestellt werden.

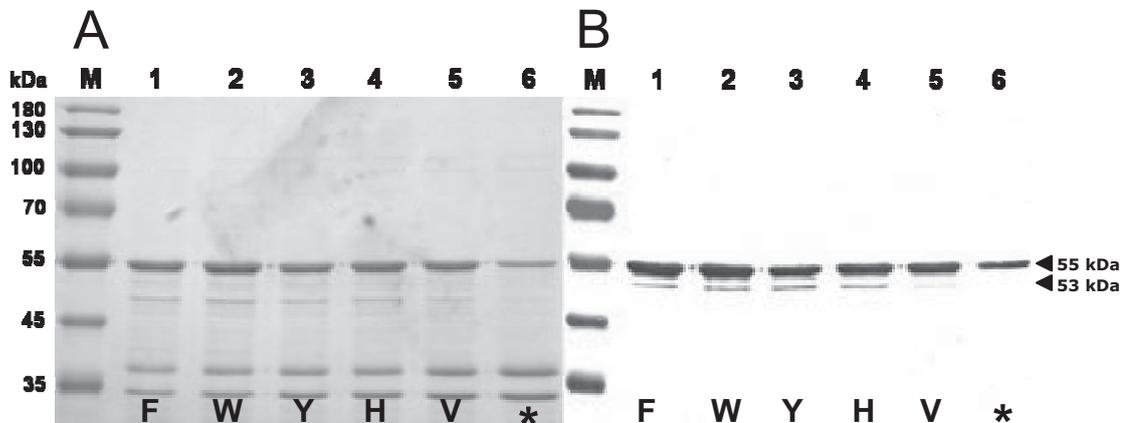


Abbildung 12: Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in *E. coli* UT5600(DE3).

Die Zellen wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteinmischung, 1: Ausgangsprotein (F485), ohne IPTG; 2: Ausgangsprotein (F485); 3: Mutante F485W; 4: Mutante F485Y; 5: Mutante F485H; 6: Mutante F485V; 7: Mutante F485* (Deletion der C-terminalen Aminosäure des β -Fasses).

Verglich man die Intensität der Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa, so zeigten das Ausgangsprotein (Spur 1), die Mutante F485W (Spur 2), die Mutante F485Y (Spur 3) und die Mutante F485H (Spur 4) ähnliche Bandenstärken. Die Mutante F485V zeigte eine verringerte Intensität (Spur 5). In Spur 6, in der die Außenmembranproteine der Mutante F485* aufgetrennt worden waren, konnte die untere Bande nicht mehr detektiert werden. Die Aromatizität der C-terminalen Aminosäure nimmt direkten Einfluss auf die Membranständigkeit des Proteins, das sich in der Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa befindet. Ging die Aromatizität verloren, aber die Hydrophobizität blieb bestehen (Mutante F485V), verringerte sich die Menge an membranständiger, unterer Bande. Gingen sowohl Aromatizität wie Hydrophobizität verloren (Mutante F485*), konnte keine membranständige, untere Bande nachgewiesen werden.

7.2.4 Oberflächenständigkeit des Passagiers des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in *E. coli* UT5600(DE3)

Im vorangegangenen Kapitel wurde nachgewiesen, dass sich das Ausgangsprotein (F485) und seine C-terminalen Mutanten in der Außenmembranproteinfraktion befinden. Mittels Durchflusszytometrie (FACS) sollte seine Orientierung nach außen gezeigt werden.

Die Hauptkulturen (20 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) von *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3, *E. coli* UT5600(DE3)pEW006, *E. coli* UT5600(DE3)pEW003, *E. coli* UT5600(DE3)pEW004, *E. coli* UT5600(DE3)pEW008 und *E. coli* UT5600(DE3)pEW005 wurden bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,5 angezogen und die Proteinexpression induziert. Die Markierung der Bakterien erfolgte nach dem Standardprotokoll unter Verwendung von Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörper und Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die Zellen wurden auf eine OD von 1 eingestellt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Zellen, die das Ausgangsprotein (F485) (**Abbildung 13 B**) exprimierten zeigten eine elffache, Mutante F485W (**Abbildung 13 C**) eine achtfache, Mutante F485Y (**Abbildung 13 D**) eine neunfache und Mutante F485H (**Abbildung 13 E**) eine siebenfache Erhöhung der mittleren Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Expressionsplasmid (**Abbildung 13 A**). Wurden die Werte aus mehreren Messungen gemittelt, so näherten sich die Fluoreszenzen der Bakterien, die die Proteine mit aromatischem C-Terminus exprimierten, einander an. Sie zeigten eine zwölfwache Erhöhung der mittleren Fluoreszenz. Die Zellen, die die Mutante F485V exprimieren (**Abbildung 13 F**), zeigten eine dreifache Erhöhung der mittleren Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle. Wurden mehrere Messungen gemittelt, ergab sich eine Halbierung der mittleren Fluoreszenz im Vergleich zum Ausgangsprotein. Damit mussten die Epitope des Ausgangsproteins, der Mutante F485W, der Mutante F485Y, der Mutante F485H und der Mutante F485V nach außen gerichtet sein. Die Menge an markierbaren Epitopen verringerte sich bei Mutante F485V um die Hälfte im Vergleich zum Ausgangsprotein und zu den Mutanten, die am C-Terminus eine aromatische Aminosäure besitzen. Die mittlere Fluoreszenz der Mutante F485* (**Abbildung 13 G**) lag in derselben Größenordnung wie die der Negativkontrolle (**Abbildung 13 A**). Sie zeigte keine spezifisch markierbaren Epitope auf der Oberflä-

che. Die Menge an oberflächenständigen Epitopen korrelierte mit der Menge der Proteinform mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa (Mittel aus mehreren Experimenten) aus Kapitel 7.2.3.

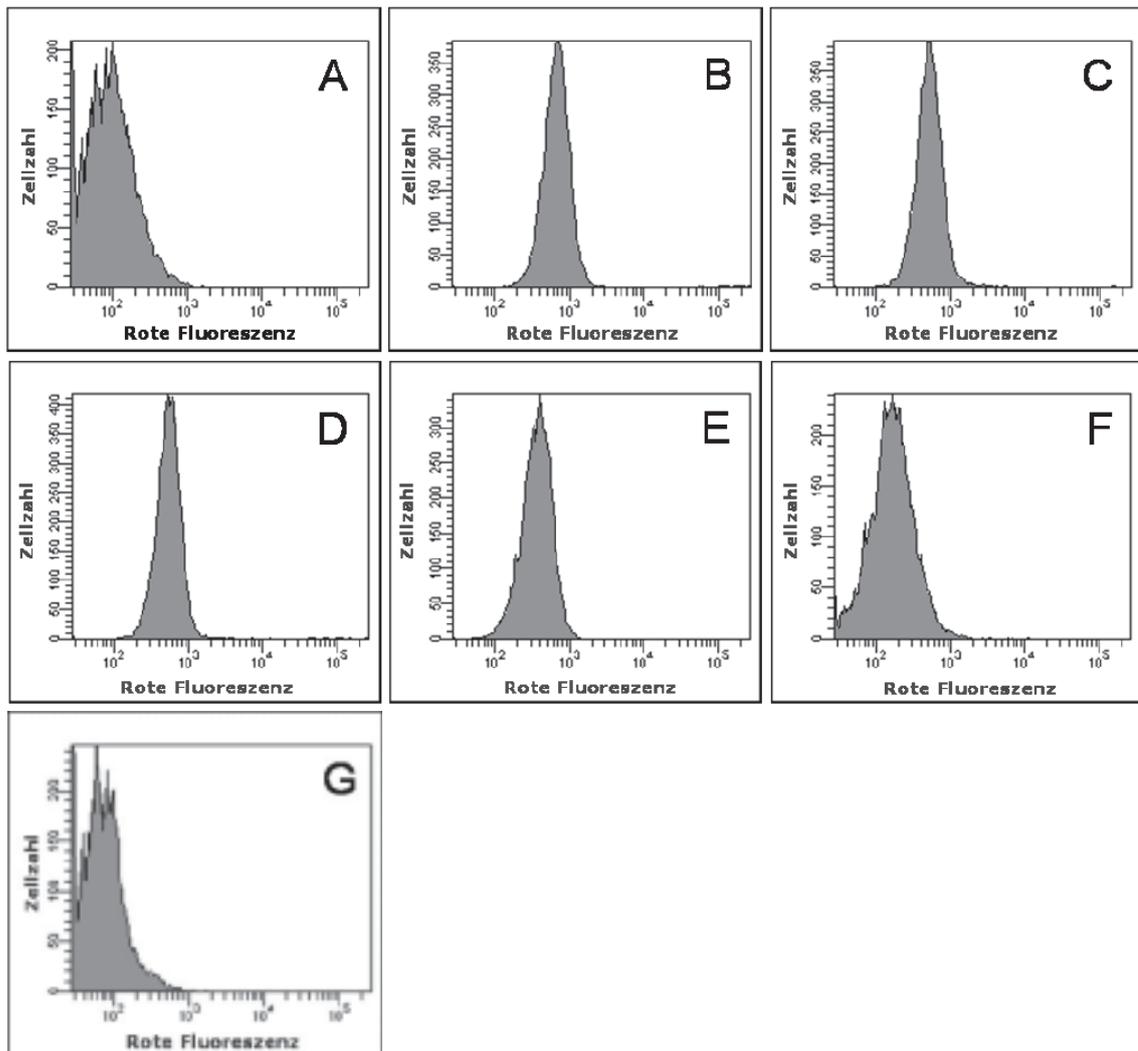


Abbildung 13: Oberflächenständigkeit eines linearen Epitops als Passagier des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in *E. coli* UT5600(DE3)

Die Bakterien wurden angezogen, die Proteinexpression induziert und das auf der Oberfläche präsentierte, lineare Epitop (PEYFK) mit einem Antikörper markiert, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt; A: UT5600(DE3) als Negativkontrolle, mF = 113; B: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren, mF = 1200; C: Zellen, die die Mutante F485W exprimieren, mF = 900; D: Zellen, die die Mutante F485Y exprimieren, mF = 1040; E: Zellen, die die Mutante F485H exprimieren, mF = 783; F: Zellen, die die Mutante F485V exprimieren, mF = 354; G: Zellen, die die Mutante F485* exprimieren, mF = 83.

7.2.5 Einfluss der Wirtsstämme *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* JK321(DE3) auf die Expression des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten

Für das Autodisplay ist es wichtig, hinreichende Mengen von funktionell in die Außenmembran integriertem Autotransporterproteins zu erhalten. Dieses sollte die innere Membran mit Hilfe des Signalpeptides überqueren und im Cytosol und im Periplasma weder in einen transportinkompetenten Zustand überführt noch degradiert werden. Neben dem oben schon verwendeten Stamm *E. coli* UT5600(DE3) schienen noch zwei weitere Stämme interessant, die im Arbeitskreis Verwendung finden: *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* JK321(DE3). *E. coli* BL21(DE3) ist einer der am verbreitetsten vorkommenden, konventionell erhältlichen Wirtsstämme und gut für die Expression von Proteinen geeignet (Novagen, Madison, USA). In *E. coli* JK321(DE3) wurde die periplasmatische Disulfidoxidoreduktase DsbA ausgeschaltet, so dass keine den Transport über die äußere Membran störenden Disulfidbrücken im Periplasma geknüpft werden können (Jose *et al.*, 1996; Jose und Handel, 2003). Alle verwendeten Stämme sind defizient für das *ompT* Gen.

Die Plasmide pET-SH3, pEW006, pEW003, pEW004, pEW008, pEW005 wurden in elektrokompetente *E. coli* BL21(DE3) und JK321(DE3) eingebracht. Die Größe der Plasmide der so erhaltenen Klone wurde durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI kontrolliert.

7.2.5.1 Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminaler Mutanten in *E. coli* BL21(DE3)

Die Hauptkulturen (80 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurden mit 800 µl der gewaschenen Übernachtskulturen von *E. coli* BL21(DE3)pET-SH3 (Ausgangsprotein), *E. coli* BL21(DE3)pEW006 (F485W), *E. coli* BL21(DE3)pEW003 (F485Y), *E. coli* BL21(DE3)pEW004 (F485H), *E. coli* BL21(DE3)pEW008 (F485V) und *E. coli* BL21(DE3)pEW005 (F485*) inokuliert und nach Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,5 nach Standardprotokoll induziert. 1 ml der Zellsuspensionen wurde auf eine OD von 0,6 eingestellt und für die Messung im Durchflusszytometer auf Eis gestellt. Die Außenmembranen wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert und mit Hilfe der SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Proteine eines Gels wurden auf eine PVDF-Mem-

bran transferiert. Das zweite Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau eingefärbt. Die Membran wurde zuerst in einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und danach in einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers inkubiert. Nach Zugabe einer Substratlösung entstand an Stellen, wo der Antikörper gebunden hatte, ein farbiges Formazan.

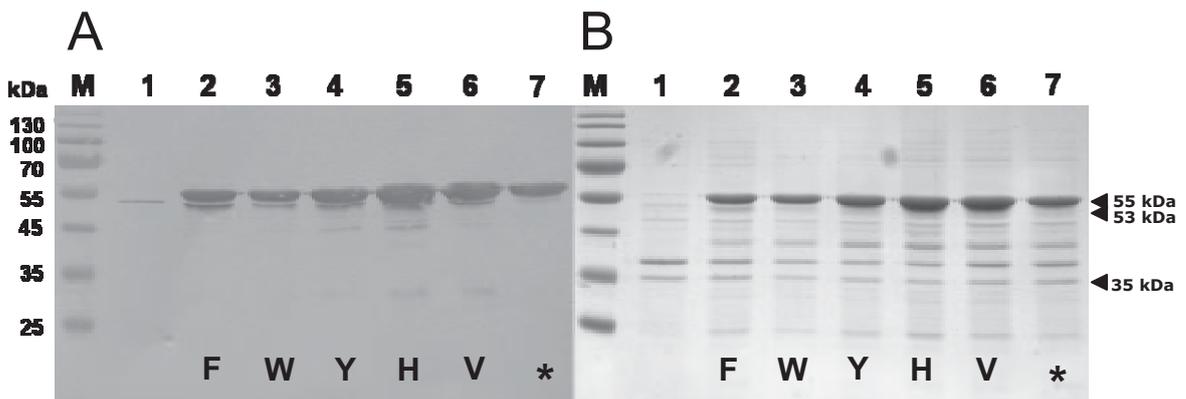


Abbildung 14: Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in *E. coli* BL21(DE3).

Die Zellen wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (B), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (A). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteinmischung, 1: Ausgangsprotein (F485), ohne IPTG; 2: Ausgangsprotein (F485); 3: Mutante F485W; 4: Mutante F485Y; 5: Mutante F485H; 6: Mutante F485V; 7: Mutante F485*.

In den Spuren 2-7 des gefärbten SDS-Gels (**Abbildung 14 A**) und des Western Blots (**Abbildung 14 B**) war eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zu sehen. Vergleicht man die Quantität der Proteine verschiedener Isolierungen im Mittel, so zeigten sich ähnliche Bandenstärken der oberen Bande beim Ausgangsprotein (Spur 2) und seinen C-terminalen Mutanten (Spur 3-7). Im Western Blot (**Abbildung 14 B**) konnte eine zweite Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa detektiert werden, was dem errechneten Molekulargewicht des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten (50 kDa) eher entsprach. Diese Bande war im SDS-Gel (**Abbildung 14 A**) wie auch schon bei der Expression in UT5600(DE3) ebenfalls zu sehen, konnte jedoch mit Hilfe der Videodokumentation nicht dargestellt werden. Die Banden erreichten im Stamm BL21(DE3), im Vergleich mit den anderen untersuchten Stämmen, die größte Quantität. Dabei schien vor allem die Menge der oberen Bande (55

kDa) zuzunehmen. In Spur 7, die den Außenmembranproteinen der Mutante F485* entsprach, war ein sehr deutliche Abnahme der Intensität der Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa zu sehen. Die Intensität der oberen Bande blieb bestehen. Die letzte Aminosäure hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Menge der Proteinform, die sich in der unteren Bande befindet. Die beiden Banden waren im Vergleich zu 7.2.3 deutlich schlechter getrennt. Die obere Bande überlagerte die untere Bande. Ein weiterer Verdünnungsschritt, der eine Quantifizierung der beiden Formen des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten möglich machen würde, wurde nicht vorgenommen, da dann die als interner Standard im SDS-Gel (**Abbildung 14 A**) dienende OmpA Bande (35 kDa) verschwinden würde. Die Proteine der Probe des Ausgangsproteins, deren Expression nicht induziert wurde (**Abbildung 14 B**, Spur 1), unterschieden sich deutlich von den anderen Spuren. Es war eine dünne, kaum sichtbare Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa vorhanden, was auf eine Basalexpression hindeutete. Das Expressionssystem war unter diesen Bedingungen nicht komplett abzuschalten.

7.2.5.2 Oberflächenständigkeit des Passagiers des Ausgangsproteins und seiner C-terminaler Mutanten in *E. coli* BL21(DE3)

Ein 1 ml Aliquot identischer Zellen wie im Kapitel zuvor beschrieben wurde nach Behandlung mit einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers (gekoppelt mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff) einer durchflusszytometrischen Untersuchung unterzogen.

Bei allen Mutanten (**Abbildung 15 C-F**) außer der Mutante F485* und dem Ausgangsprotein (**Abbildung 15 B**) war im Vergleich zu *E. coli* BL21(DE3), die kein Expressionsplasmid enthalten (**Abbildung 15 A**), eine Erhöhung des Fluoreszenzmittelwertes zu beobachten. Die Zellen, die das Ausgangsprotein (F485) (**Abbildung 15 B**) exprimierten zeigten eine vierundzwanzigfache, Mutante F485W (**Abbildung 15 C**) eine zwanzigfache, Mutante F485Y (**Abbildung 15 D**) eine zweiundzwanzigfache und Mutante F485H (**Abbildung 15 E**) eine zwanzigfache Erhöhung der mittleren Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Expressionsplasmid (**Abbildung 15 A**). Wurden die Werte aus mehreren Messungen gemittelt, so näherten sie sich für alle Mutanten mit einer aromatischen Aminosäure (F, W, Y, H) am C-Terminus einander an

und zeigten eine etwa sechszehnfache Zunahme der mittleren Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle *E. coli* BL21(DE3). Die F485V-Mutante zeigte im Vergleich zu den Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren, eine Halbierung der mittleren Fluoreszenz (Abbildung 15 F). Wurde, wie im Fall der Mutante F485*, die carboxyterminale Aminosäure komplett entfernt, bewegt sich die Fluoreszenz im gleichen Bereich wie die der Negativkontrolle. Die Bakterien zeigten somit keine spezifisch markierbaren Epitope auf der Oberfläche.

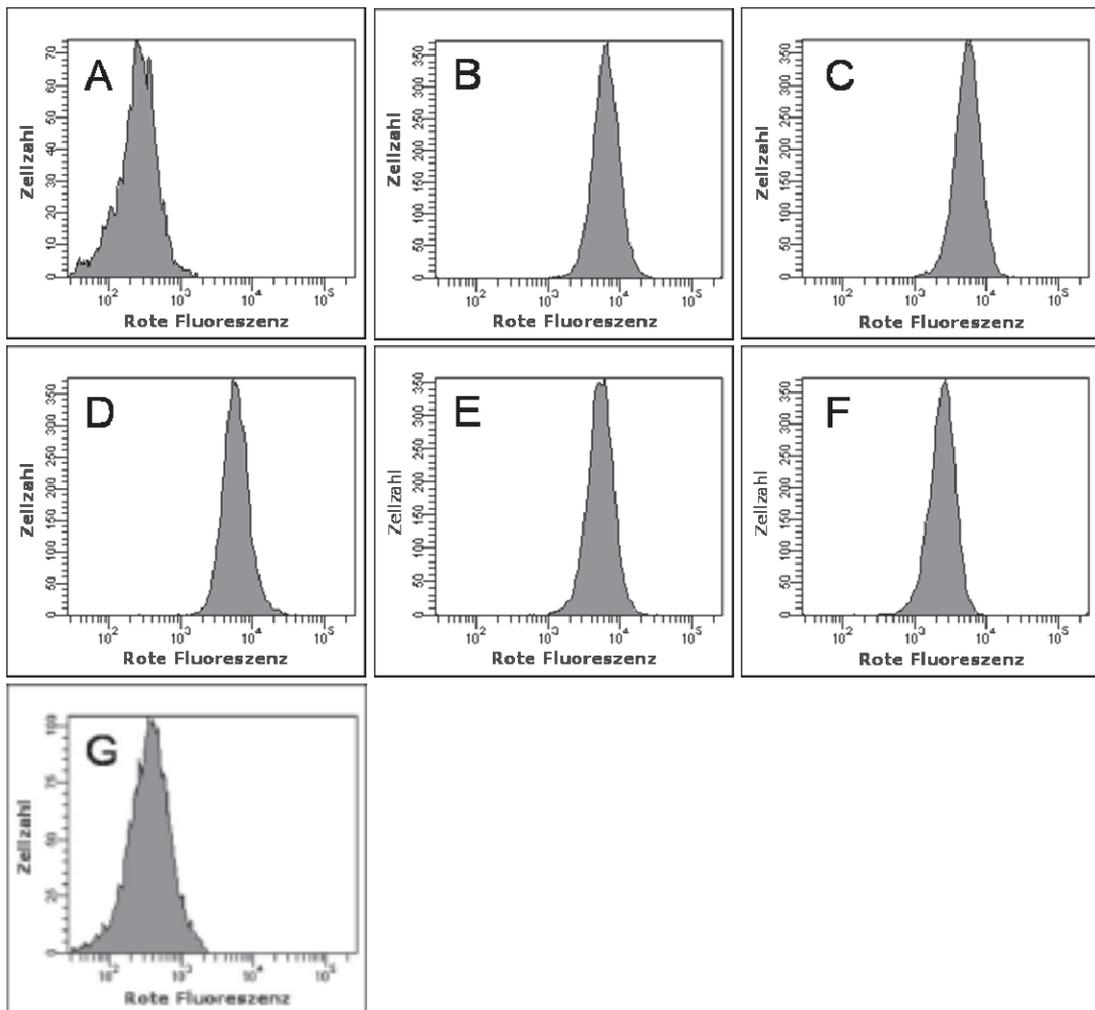


Abbildung 15: Oberflächenständigkeit eines linearen Epitops als Passagier des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in *E. coli* BL21(DE3)

Die Bakterien wurden angezogen, die Proteinexpression induziert und das auf der Oberfläche präsentierte, lineare Epitop (PEYFK) mit einem Antikörper markiert, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt; A: BL21(DE3) als Negativkontrolle, mF = 291; B: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren, mF = 7026; C: Zellen, die die Mutante F485W exprimieren, mF = 6005; D: Zellen, die die Mutante F485Y exprimieren, mF = 6551; E: Zellen, die die Mutante F485H exprimieren, mF = 5884; F: Zellen, die die Mutante F485V exprimieren, mF = 2886; G: Zellen, die die Mutante F485* exprimieren, mF = 428.

7.2.5.3 Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminaler Mutanten in *E. coli* JK321(DE3)

Die Hauptkulturen (100 µg/ml Ampicillin) wurden mit 400 µl einer Übernachtskultur von *E. coli* JK321(DE3), JK321(DE3)pET-SH3, JK321(DE3)pEW006, JK321(DE3)pEW003, JK321(DE3)pEW004, JK321(DE3)pEW008 und JK321(DE3)pEW005 inokuliert und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 inkubiert. Die Kulturen wurden geteilt. Ein Teil wurde weiter inkubiert, im anderen Teil wurde die Proteinexpression induziert. Nachdem alle Proben für fünfzehn Minuten auf Eis gelagert worden waren, wurde jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer OD von 0,6 für Experimente im Durchflusszytometer separat auf Eis gelagert. Aus den restlichen Proben wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) die Außenmembranproteine isoliert. Die aufgereinigten Membranproteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein SDS-Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. Die Proteine des zweiten Gels wurden auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde zuerst in einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und dann in einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers geschüttelt. Nach Zugabe einer Substratlösung entstand an den Stellen, wo Antikörper gebunden hatte, eine Violett-färbung.

In den Spuren 2-7 des gefärbten SDS-Gels (**Abbildung 16 A**) und des Western Blots (**Abbildung 16 B**) war eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zu sehen. Verglich man die Quantität der Proteine verschiedener Isolierungen im Mittel, so zeigten sich ähnliche Bandenstärken der oberen Bande beim Ausgangsprotein (Spur 2) und seinen C-terminalen Mutanten (Spur 3-7). Im Western Blot (**Abbildung 16 B**) konnte noch eine zweite Bande in den Spuren 2-6 mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa detektiert, was eher dem errechneten Molekulargewicht des Ausgangsproteins (50 kDa) entsprach. Diese Bande war im SDS-Gel (**Abbildung 16A**) auch vorhanden, konnte jedoch mit Hilfe des Videodokumentationssystems nicht dargestellt werden. Verglich man die Quantität der unteren Banden, so zeigten das Ausgangsprotein (Spur 2), die Mutante F485Y (Spur 4) und die Mutante F485H (Spur 5) ähnliche Bandenstärken. Die Mutante F485W zeigte wie auch schon bei der Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa in diesem Experiment eine verringerte Bandenstärke. Wurden mehrere SDS-Gele und Western Blots miteinander verglichen,

so zeigte die Mutante F485W jedoch eine ähnliche Bandenstärke der Banden mit einem Molekulargewicht von 55 und 53 kDa wie das Ausgangsprotein und die Mutanten F485Y und F485H. Die gezeigte Auftrennung wurde gewählt, da sie die beste Videodokumentation erlaubte.

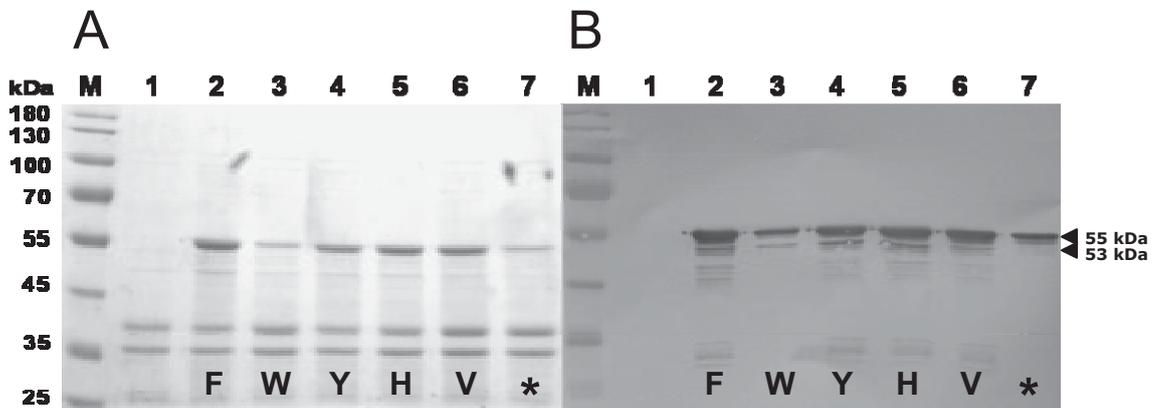


Abbildung 16: Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in *E. coli* JK321(DE3).

Die Zellen wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteinmischung, 1: Ausgangsprotein (F485), ohne IPTG; 2: Ausgangsprotein (F485); 3: Mutante F485W; 4: Mutante F485Y; 5: Mutante F485H; 6: Mutante F485V; 7: Mutante F485*.

Die Mutante F485V zeigt eine leicht verringerte Bandenstärke (Spur 6). In Spur 7 des Western Blots (**Abbildung 16 B**), die den Außenmembranproteinen der Mutante F485* entsprach, war die Bande nicht detektierbar. Die Stärke der oberen Bande blieb bestehen. Die C-terminale Aminosäure hatte einen Einfluss auf die Ausprägung der beiden Banden des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Varianten. Die Aromatizität spielte eine entscheidende Rolle. War die C-terminale Aminosäure lediglich hydrophob, verringerte sich die Menge der Proteinform mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa. Wurde diese Aminosäure deletiert, war der C-Terminus durch Serin besetzt (nicht aromatisch, nicht hydrophob). Die Proteinform, die die untere Bande repräsentiert, konnte nicht mehr detektiert werden. Die Intensität der Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa wurde nicht durch die C-terminale Aminosäure beeinflusst. Die Proteine der Probe des Ausgangsproteins, deren Expression nicht induziert wurde (**Abbildung 16 B**, Spur 1), unterschieden sich deutlich von den anderen

Spuren. Es konnte keine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 oder 55 kDa detektiert werden. Im Gegensatz zu den Wirtsstämmen UT5600(DE3) und BL21(DE3) trat keine Basalexpression auf.

7.2.5.4 Oberflächenständigkeit des Passagiers des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in *E. coli* JK321(DE3)

Ein 1 ml Aliquot identischer Zellen (siehe 7.2.5.3) wurde nach einer Inkubation mit einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers (gekoppelt mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff) im Durchflusszytometer analysiert.

Bei allen Varianten (**Abbildung 17 B-F**) mit einer aromatischen oder hydrophoben C-terminalen Aminosäure war im Vergleich zu *E. coli* JK321(DE3), die kein Expressionsplasmid enthielten (**Abbildung 17 A**), eine Erhöhung des Fluoreszenzmittelwertes zu beobachten. Die Zellen, die das Ausgangsprotein (F485) (**Abbildung 17 B**) exprimierten zeigten eine zwölffache, Mutante F485W (**Abbildung 17 C**) eine zwanzigfache, Mutante F485Y (**Abbildung 17 D**) eine vierzehnfache und Mutante F485H (**Abbildung 17 E**) eine dreizehnfache Erhöhung der mittleren Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Expressionsplasmid (**Abbildung 17 A**). Wurden die Werte aus mehreren Messungen gemittelt, so näherten sie sich für alle Mutanten mit einer aromatischen Aminosäure (F, W, Y, H) am C-Terminus einander an und zeigten eine zwölffache Zunahme der mittleren Fluoreszenz (**Abbildung 17 B, C, D, E**) im Vergleich zur Negativkontrolle *E. coli* JK321(DE3) (**Abbildung 17 A**). Die F485V-Mutante zeigte eine Verminderung der Fluoreszenz auf das fünffache (**Abbildung 17 F**) im Vergleich zu den Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren (**Abbildung 17 B**). Wurde die carboxyterminale Aminosäure, wie im Fall der F485* Mutante, deletiert, so befand sich die gemessene Fluoreszenz im gleichen Bereich wie die der Negativkontrolle (**Abbildung 17 G**). Es sind offensichtlich keine spezifisch markierbaren Epitope auf der Oberfläche der Zellen nachweisbar.

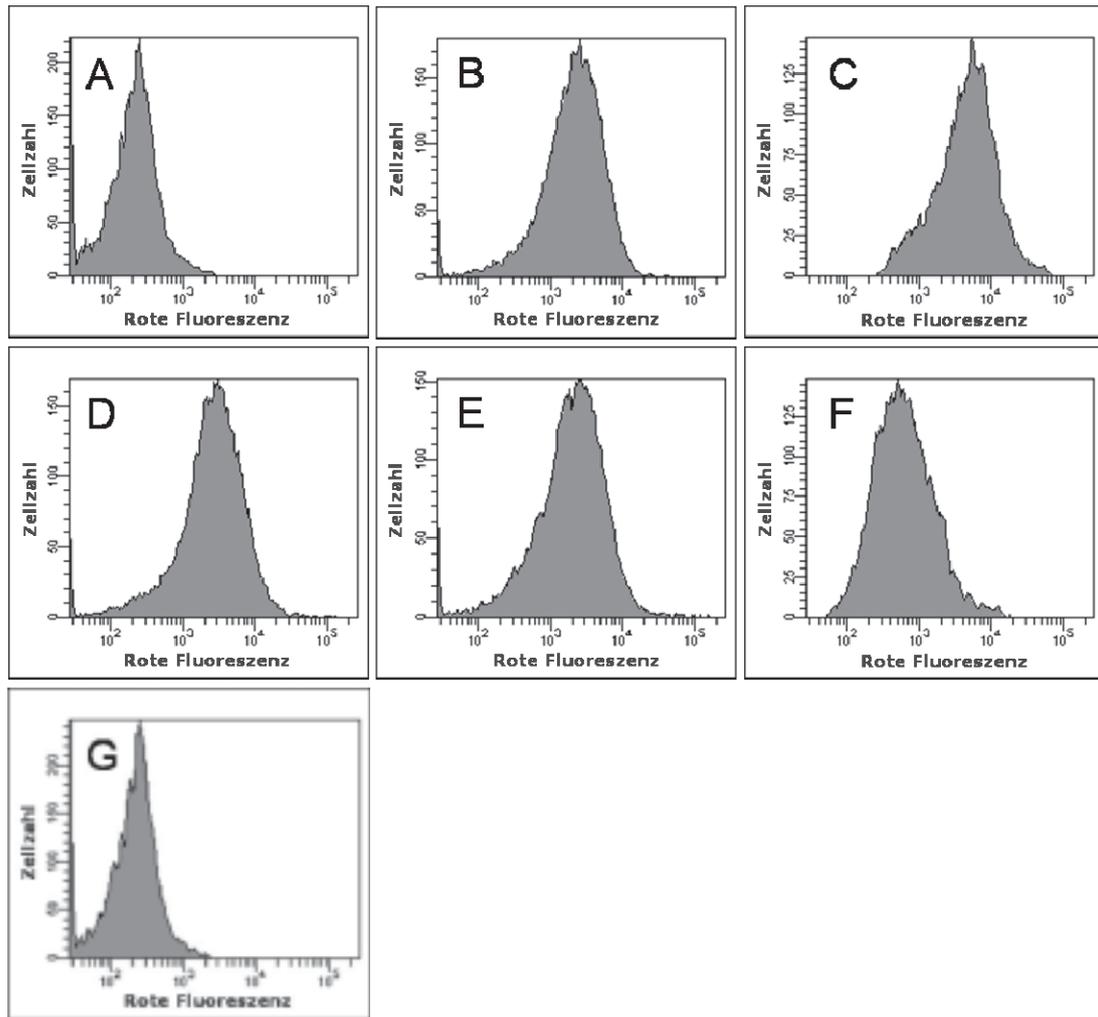


Abbildung 17: Oberflächenständigkeit eines linearen Epitops als Passagier des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in *E. coli* JK321(DE3)

Die Bakterien wurden angezogen, die Proteinexpression induziert und das auf der Oberfläche präsentierte, lineare Epitop (PEYFK) mit einem Antikörper markiert, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. A: JK321(DE3) als Negativkontrolle, mF = 252; B: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren, mF = 3107; C: Zellen, die die Mutante F485W exprimieren, mF = 5518; D: Zellen, die die Mutante F485Y exprimieren, mF = 3602; E: Zellen, die die Mutante F485H exprimieren, mF = 3226; F: Zellen, die die Mutante F485V exprimieren, mF = 933; G: Mutante F485*, mF = 310

7.3 Charakterisierung der zwei Expressionsformen des Ausgangsproteins

In den vorangegangenen Experimenten konnten zum ersten Mal zwei verschiedene Proteinformen für das Ausgangsprotein im Autodisplay System detektiert werden, die sich sowohl in Quantität wie auch in der Größe unterschieden. Sie tauchten in allen Konstrukten auf, deren Proteinexpression durch Induktion stark stimuliert wurde. Beide

Formen des Proteins unterschieden sich im apparenten Molekulargewicht um ca. 2 kDa und konnten spezifisch durch den Maus-Anti-PEYFK-Antikörper markiert werden.

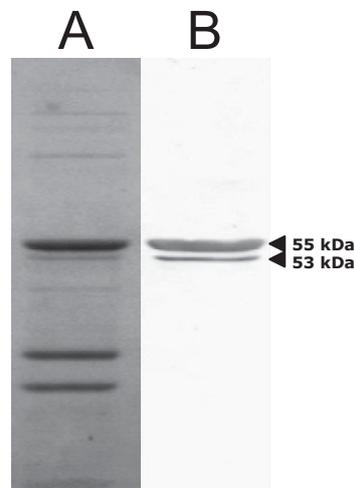


Abbildung 18: Nachweis von zwei Expressionsformen des Ausgangsproteins im Außenmembranproteinisolat von *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3

Die Zellen wurden angezogen, die Proteinexpression bei einer OD=0,5 induziert und die Außenmembranproteine isoliert. Die Proben wurden hinreichend verdünnt und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde erst gestoppt, wenn die Markerbande des Bromthymolblau fünfzehn Minuten aus dem Gel gelaufen war. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten.

Sowohl im SDS-Gel (**Abbildung 18 A**), wie auch im Western Blot (**Abbildung 18 B**), war eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa und eine zweite Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa zu sehen, was eher dem errechneten Molekulargewicht des Ausgangsproteins (50 kDa) entsprach. Die untere Bande war nur detektierbar, wenn die Probe hinreichend verdünnt vorlag und die Laufstrecke der Proteine während der Elektrophorese verlängert wurde. Die Elektrophorese wurde erst gestoppt, wenn die als Marker verwendete Bromthymolblau Front fünfzehn Minuten aus dem Gel heraus gelaufen war. Die Proteinmenge der beiden Banden unterschied sich. Das Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa lag offensichtlich in größerer Menge vor als das Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa (**Abbildung 19**). Es konnte vermutet werden, dass es sich bei der Bande, auf die in früheren Experimenten optimiert wurde, um eine Mischbande aus den beiden Expressionsformen handelte, wobei die Menge der obere Bande überwog.

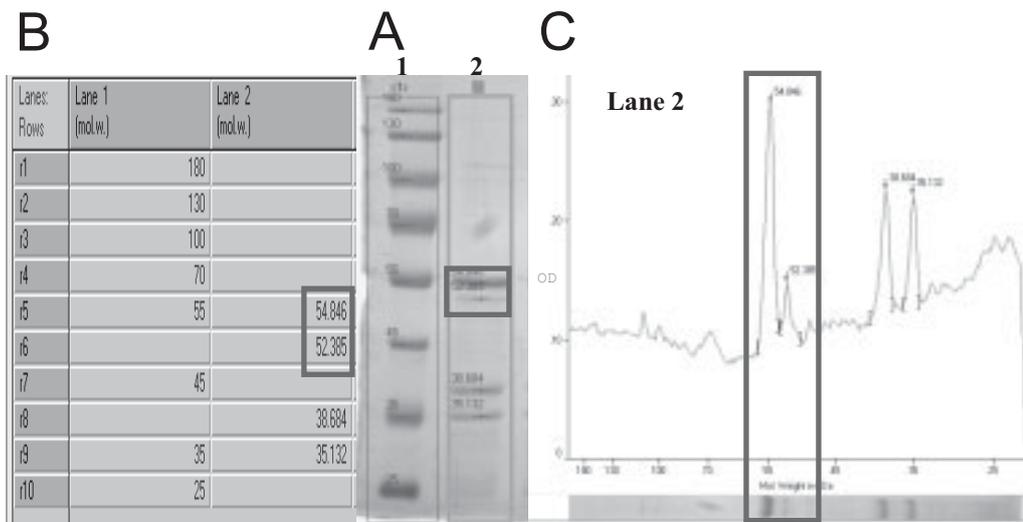


Abbildung 19: Bestimmung des Molekulargewichtes der beiden Expressionsformen des Ausgangsproteins mit Hilfe der GelProAnalyzer Software

(A) Festlegung der einzelnen Spuren (1,2) und Kalibrierung der Markerbanden (Lane 1); (B) Molekulargewicht der einzelnen Banden des Markers (Lane 1) und der aufgetrennten Außenmembranproteine (Lane 2). Es wurde für die obere Bande ein MW=54,8 kDa und für die untere Bande ein MW=52,3 kDa ermittelt. (C) Profil der Lane 2: Molekulargewicht und Dichte der einzelnen Proteinbanden: Die obere Bande hat eine höhere Dichte als die untere Bande.

Für Außenmembranproteine, die β -Fass-Anteile enthalten, sind eine Reihe typischer Verhaltensmuster bekannt, mit deren Hilfe es möglich ist, sie von anders strukturierten Proteinen abzugrenzen und ihre Funktionalität nachzuweisen. Die Bindungen dieser speziellen dreidimensionalen Anordnung sind besonders stark und die enthaltenen Aminosäuren werden abgeschirmt. Zum Ersten ist die recht hohe Beständigkeit solcher Proteine gegen Denaturierung zu nennen (Heller, 1978). Eine Auflösung höherer Strukturen erfolgt nicht durch den alleinigen Zusatz des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), wie bei anders strukturierten Proteinen, sondern erfordert ein Erhitzen auf mindestens 70°C. Dieses Verhalten wurde schon für die ersten Autotransporterkonstrukte aus dem Arbeitskreis nachgewiesen (Maurer *et al.*, 1999). Zum Zweiten ist die Beständigkeit des β -Fasses gegen den enzymatischen Abbau durch Proteasen zu nennen (Schweizer *et al.*, 1978). Da die Enzyme zu groß sind, um eine intakte Bakterienmembran zu überqueren, wird bei einem Verdau ganzer Zellen der Teil des Proteins, der oberflächenständig ist (Passagier und Linkeranteil), verdaut. Zurück bleibt nur der gefaltete und in die Außenmembran integrierte Anteil, auch Protease resistenter Kern genannt. Dieses Verhalten wurde schon früher für Autotransporterkonstrukte aus dem Ar-

beitskreis bestätigt (Jose *et al.*, 1996; Maurer *et al.*, 1997; Jose *et al.*, 2001; Schultheiss *et al.*, 2002).

7.3.1 Nachweis der Faltung des Ausgangsprotein

Die Hauptkultur (280 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 2,8 ml einer Übernachtskultur (gewaschen) von *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3 beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 angezogen. Die Proteinexpression wurde induziert und die Kultur in sieben Proben von 40 ml aufgeteilt. Die Außenmembranproteine wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert, in reduzierendem Probenpuffer resuspendiert und bei unterschiedlichen Temperaturen (37°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C) zehn Minuten inkubiert. Die Proben mit Hilfe der SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde zuerst in einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und dann in einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers inkubiert. Nach Zugabe einer Substratlösung färbten sich die Stellen, wo der Antikörper gebunden hatte.

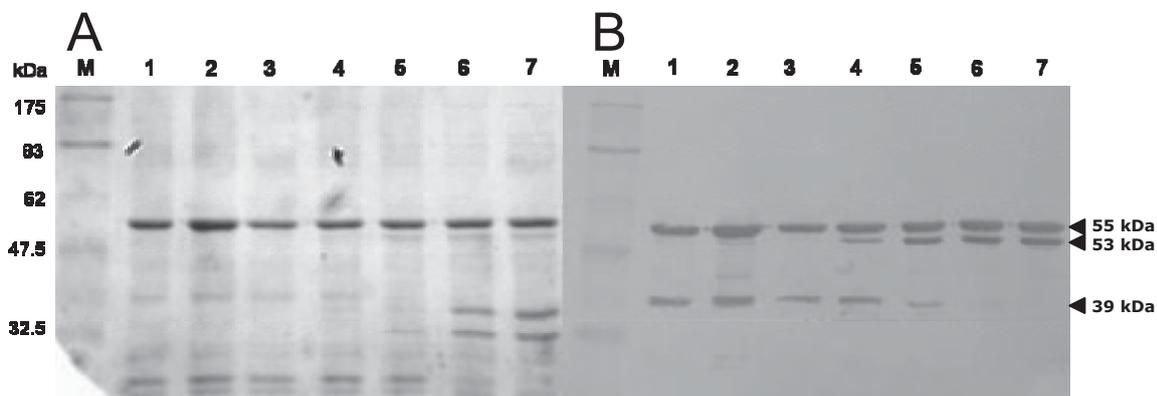


Abbildung 20: Unterschiedliche Hitzedenaturierbarkeit der beiden Formen des Ausgangsprotein

Die Zellen wurden angezogen bis zu einer optischen Dichte von 0,5, die Proteinexpression induziert und die Außenmembranproteine isoliert. Die Proben wurden bei verschiedenen Temperaturen hitzedenaturiert und die Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE getrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteinmischung; 1: Ausgangsprotein, Denaturierung bei 37°C; 2: Ausgangsprotein, Denaturierung bei 50°C; 3: Ausgangsprotein, Denaturierung bei 60°C; 4: Ausgangsprotein, Denaturierung bei 70°C; 5: Ausgangsprotein, Denaturierung bei 80°C; 6: Ausgangsprotein, Denaturierung bei 90°C; 7: Ausgangsprotein, Denaturierung bei 100°C.

In allen Spuren des SDS-Gels (**Abbildung 20 A**) und des Western Blots (**Abbildung 20 B**) ist eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zu erkennen. Ihre Position ist unabhängig von der Temperatur, mit der die Proben gelöst wurden. Ab Spur 4 (70°C) erscheint kurz darunter eine zweite Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa. In den Spuren 1-5 kann eine dritte Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 39 kDa detektiert werden. Die Abnahme dieser Bande korreliert mit der Zunahme der Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa. Es handelt sich um die noch nicht denaturierte Form des Ausgangsproteins, die aufgrund ihrer Faltung ein niedrigeres apparentes Molekulargewicht zeigt. Die Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa zeigt damit die für β -Fass-Proteine typische verzögerte Hitzedenaturierung auch in Gegenwart von Detergenzien wie Sodiumdodecylsulfat. Sie liegt im nicht denaturierten Zustand in einer gefalteten und damit funktionellen Form vor. Die Form des Ausgangsproteins, die ein apparentes Molekulargewicht von 55 kDa hat, zeigt dieses Verhalten nicht. Sie liegt offensichtlich in einer leichter denaturierbaren und damit möglicherweise in einer nicht funktionellen Form vor, was den Transport der Passagierdomäne auf die Oberfläche erschweren oder verhindern könnte.

7.3.2 Nachweis der Faltung der Mutante F485V

Wie in Kapitel 7.2.4 mit Hilfe der Durchflusszytometrie gezeigt, ist die Passagierdomäne der Mutante F485V oberflächenständig. Sie zeigt jedoch, im Vergleich zu den Mutanten mit einer aromatischen Aminosäure am C-Terminus, eine verminderte Fluoreszenz, also weniger markierbare Epitope auf der Oberfläche. Im Western Blot (**Abbildung 12 B**) konnten zwei unterschiedliche Proteinformen detektiert werden. Die Mutante F485V, deren C-Terminus eine hydrophobe jedoch nicht aromatische Aminosäure bildet, sollte auf ihre Hitzedenaturierbarkeit untersucht werden.

Der Stamm UT5600(DE3)pEW008 wurden wie unter 7.3.1 angezogen und die Proteinexpression induziert. Die Außenmembranproteine wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) aufgereinigt und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Nach der Auftrennung der Proteine über eine SDS-PAGE (10% Acrylamid), wurden die Proteine des Gels auf eine PVDF-Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern markiert.

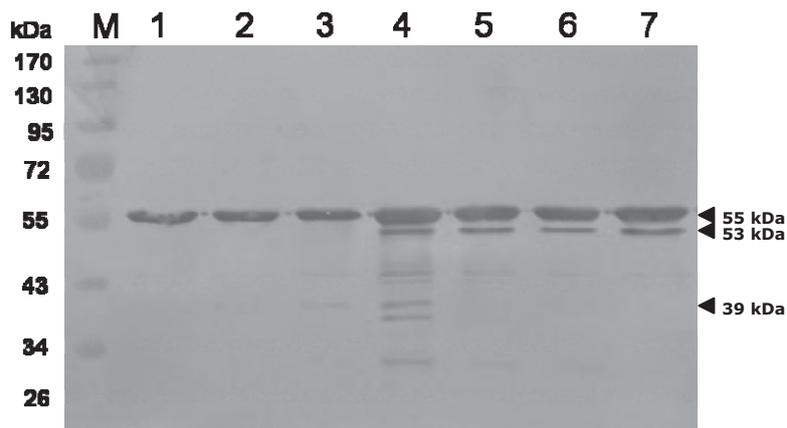


Abbildung 21: Unterschiedliche Hitzedenaturierbarkeit der beiden Formen der Mutante F485V

Die Zellen wurden angezogen bis zu einer optischen Dichte von 0,5, die Proteinexpression induziert und die Außenmembranproteine isoliert. Die Proben wurden bei verschiedenen Temperaturen hitzedenaturiert und die Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE getrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolyolphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch; 1: Mutante F485V, Denaturierung bei 37°C; 2: Mutante F485V, Denaturierung bei 50°C; 3: Mutante F485V, Denaturierung bei 60°C; 4: Mutante F485V, Denaturierung bei 70°C; 5: Mutante F485V, Denaturierung bei 80°C; 6: Mutante F485V, Denaturierung bei 90°C; 7: Mutante F485V, Denaturierung bei 100°C.

In allen Spuren des Western Blots (**Abbildung 21**) war eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zu erkennen. Ihre Position war unabhängig von der Temperatur, mit der die Proben nach der Isolierung behandelt wurden. Ab Spur 4 (70°C) erschien kurz darunter eine zweite Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa. In Spur 4 war eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 39 kDa zu sehen, die ab einer Temperatur von 70 °C mit dem Erscheinen der Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa wieder verschwand. Diese Bande war auch schwach in den Spuren 1, 2 und 3 zu sehen, konnte allerdings nicht mit dem Dokumentationssystem abgebildet werden. Es handelte sich um die nicht denaturierte Form des Ausgangsproteins. Die Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa zeigt damit die für β -Fass-Proteine typische verzögerte Hitzedenaturierung auch in Gegenwart von Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat. Sie liegt, wie beim Ausgangsprotein schon gezeigt, im nicht denaturierten Zustand in einer gefalteten und damit wahrscheinlich funktionellen Form vor. Die Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zeigt dieses Verhalten nicht. Sie liegt in einer leichter denaturierbaren und damit wahrscheinlich nicht funktionellen Form vor.

7.3.3 Nachweis der Oberflächenständigkeit des Passagiers des Ausgangs-proteins durch Verdau mit extrazellulär zugesetzten Proteasen

Eine Hauptkultur (160 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 1,6 ml einer Übernachtskultur (gewaschen) von *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3 beimpft. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 wurde die Proteinexpression induziert. Bevor es zu einer Präparation der Außenmembranproteine kam, wurden die Bakterien einem Ganzzellverdau durch zwei verschiedene Proteasen (Trypsin, Proteinase K) unterzogen. Die Kultur wurde in vier Proben mit jeweils 40 ml aufgeteilt. Probe 1 diente als Negativkontrolle und lagerte unbehandelt auf Eis, Probe 2 wurde unter Standardbedingungen mit Proteinase K und Probe 3 und 4 mit unterschiedlichen Konzentrationen an Trypsin verdaut (Endkonzentration: 0,025% bzw. 0,075%). Danach wurden die Außenmembranproteine aller vier Proben nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert. Mit Hilfe der SDS-PAGE (10% Acrylamid) wurden die Proben aufgetrennt und die Proteine eines Gels auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde zuerst in einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und dann in einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers inkubiert. Nach Zugabe einer Substratlösung entstand an den Stellen, wo Antikörper gebunden worden war, ein rotviolettes Formazan.

Im SDS-Gel (**Abbildung 22 A**) und im Western Blot (**Abbildung 22 B**) war in den Spuren 1-4 eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zu sehen. Die Proteinmenge dieser Form des Ausgangsproteins änderte sich auch nach dem Zusatz von Proteinase K und Trypsin nicht. Der Teil der Linkerdomäne, der die Schnittstellen für die Proteasen enthält, befand sich also nicht extrazellulär. Das Passagierepitop konnte sich damit ebenso nicht an der Oberfläche der Zellen befinden. Im SDS-Gel (**Abbildung 22 A**) und im Western Blot (**Abbildung 22 B**) war in Spur 1 eine weitere Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa zu sehen. Diese Form des Ausgangsproteins verschwand nach Behandlung der ganzen Zellen mit den Proteasen fast vollständig (Spuren 2-4), da sich durch den Verdau das Molekulargewicht um den oberflächenständigen Teil des Proteins verringerte. Der Teil der Linkerdomäne, der die Schnittstellen für die Proteasen enthielt, befand sich extrazellulär.

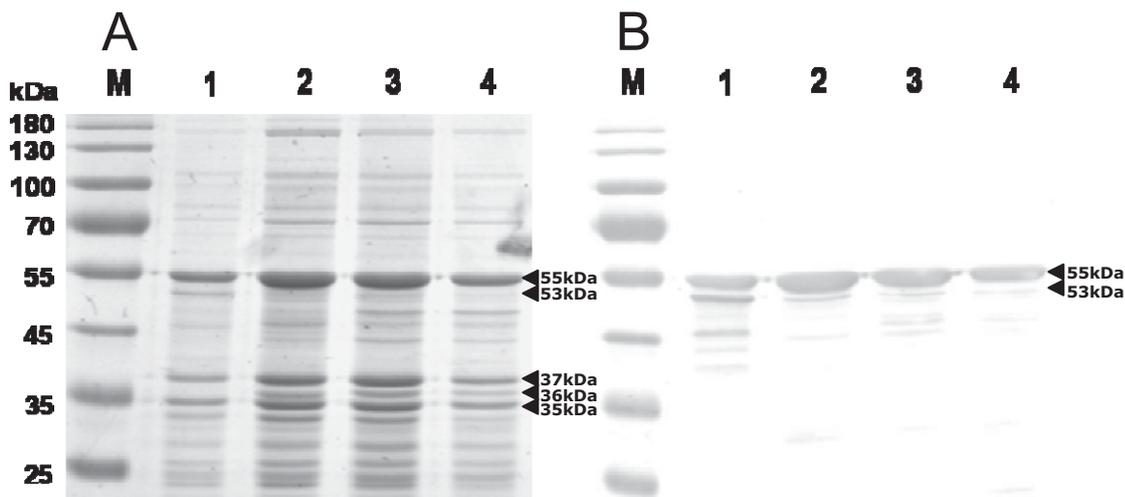


Abbildung 22: Ganzzellverdau als Nachweis der Oberflächenständigkeit der funktionellen Form des Ausgangsproteins

Die Bakterien wurden angezogen, die Proteinexpression bei einer $OD=0,5$ induziert, die ganzen Zellen mit Trypsin in unterschiedlichen Konzentrationen oder mit Proteinase K verdaut und die Außenmembranproteine isoliert. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch; 1: Ausgangsprotein, unverdaut, 2: Ausgangsprotein, Ganzzellverdau mit Proteinase K, 3: Ausgangsprotein, Ganzzellverdau mit Trypsin, 4: Ausgangsprotein, Ganzzellverdau mit Trypsin (dreifache Konzentration).

Damit musste auch das N-terminal vom Linker gelegene Passagierepitop auf der Oberfläche der Zellen positioniert sein. Im SDS-Gel (**Abbildung 22 A**) konnte in den Spuren 2-4 der Protease resistente Kern mit einem apparenten Molekulargewicht von 36 kDa zwischen der OmpA Bande (35 kDa) und der OmpF/C Bande (37 kDa) detektiert werden. Dabei handelte es sich um den Teil des Ausgangsproteins, der als β -Fass Struktur in die Membran integriert war und damit gegen den Angriff der Enzyme abgeschirmt wurde.

7.3.4 Nachweis der Oberflächenständigkeit eines Passagiers des Ausgangsproteins durch Verdau mit einer außenmembranständigen Protease

Im voran gegangenen Kapitel konnte wurde gezeigt, dass der nach außen gerichtete Anteil des Ausgangsproteins für den Verdau mit extrazellulär zugesetzten Proteasen zugänglich ist. In vielen Fällen ist es von großer Wichtigkeit, nicht nur das transportierte Protein funktionell zu untersuchen, sondern auch durch die dazu korrespondie-

rende DNA-Sequenz Informationen über die Aminosäurezusammensetzung zu gewinnen. Deshalb sollten diese beiden Parameter miteinander verknüpft bleiben. Das Auto-display System bietet diese Möglichkeit, indem das zu untersuchende Protein als Passagieranteil des Autotransporters über die Linkerdomäne mit dem β -Fass verankert bleibt. Der Stamm DH5 α war im Gegensatz zu den anderen, in dieser Arbeit untersuchten Bakterienstämmen, nicht defizient für die auf der Außenmembran lokalisierte Protease OmpT (Baneyx und Georgiou, 1990). Da sich im außenmembranständigen Teil der Linkerregion Schnittstellen für diese Protease befinden (Maurer *et al.*, 1997), wird das als Passagier translozierte Epitop in den Überstand entlassen (Abbildung 23).

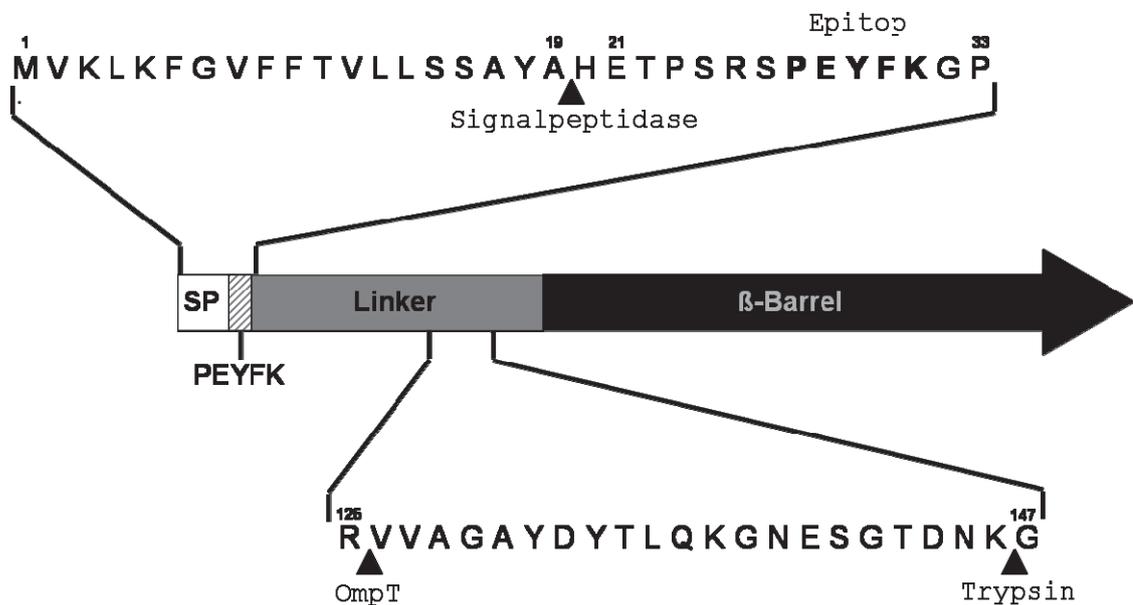


Abbildung 23: Struktur des Ausgangsproteins mit Proteaseschnittstellen

Das Signalpeptid aus *V. cholerae* wird durch eine weiße, die Linkerregion aus AIDA-I aus *E. coli* durch eine graue und das β -Fass aus AIDA-I aus *E. coli* durch eine schwarze Box symbolisiert. Die schraffierte Box symbolisiert die Lage des Epitops PEYFK. Die Bereiche von Interesse wurden als Aminosäuresequenz dargestellt. Proteaseschnittstellen sind mit Pfeilen markiert, das Passagierepitop (PEYFK) ist mit Hilfe von fetten Buchstaben hervorgehoben.

Bevor die Untersuchungen durchgeführt werden konnten, musste das λ DE3-Gen in die chromosomale DNA des Stammes *E. coli* DH5 α eingebracht werden. Diese Veränderung des Chromosoms machte es möglich, die Übersetzung des Autotransporterfusionsgens zu initiieren. Die Bakterien wurden nach dem Protokoll des λ DE3 Lysogenization Kit der Firma Novagen (Madison, USA) behandelt (Studier und Moffatt, 1986; Novagen, 2003). Dabei werden die Zellen mit unterschiedlichen Bakteriophagen infiziert. Die verschiedenen Phagen sorgen für die Integration des Gens in das bakterielle

Chromosom und Selektionieren die infizierten Bakterien. Es wurde ein Klon gefunden, dessen Proteinexpression induziert werden konnte.

In den neuen Stamm *E. coli* DH5 α (DE3) wurden die Plasmide pET-SH3, pEW006, pEW003, pEW004, pEW008, pEW005 durch Elektroporation eingebracht. Die Plasmid-DNA der Klone wurde durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI kontrolliert. Alle Klone zeigten die richtige Größe.

Die Hauptkulturen (40 ml LB-Medium, 100 μ g/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurden mit 400 μ l einer gewaschenen Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α (DE3)pET-SH3, *E. coli* DH5 α (DE3) pEW006, *E. coli* DH5 α (DE3) pEW003, *E. coli* DH5 α (DE3) pEW004, *E. coli* DH5 α (DE3) pEW008 und *E. coli* DH5 α (DE3) pEW005 beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 angezogen. Die Proteinexpression wurde induziert und die Außenmembranproteine nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert. Die Überstände, die nach der Abtrennung der Zellen entstanden, wurden auf Eis gelagert und die löslichen Proteine mit 10%iger Trichloressigsäure ausgefällt. Die Proben wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und die Proteine eines Gels auf eine PVDF-Membran transferiert. Das Passagierepitop (PEYFK) wurde mit spezifischen Antikörpern markiert.

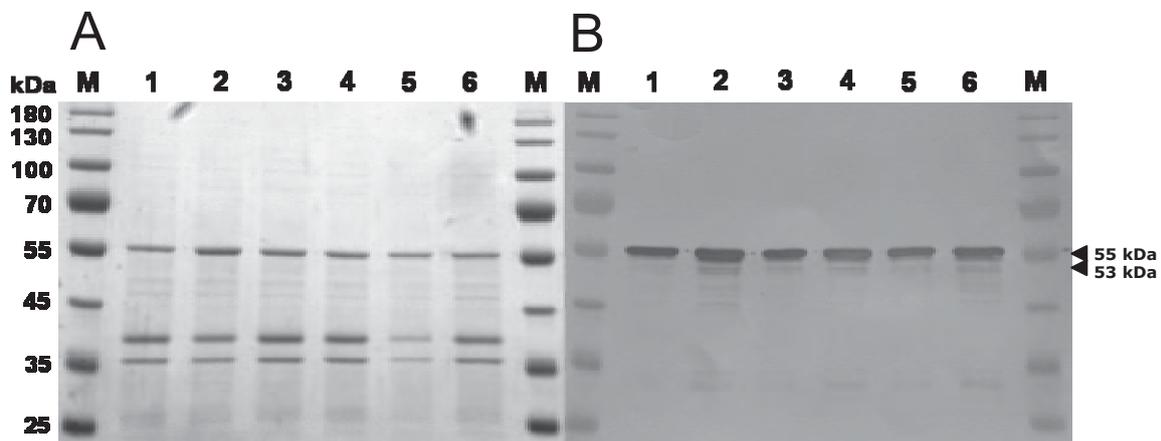


Abbildung 24: Einfluss der außenmembranständigen Protease OmpT von *E. coli* DH5 α (DE3) auf die beiden Formen des Ausgangsproteins und seiner carboxyterminalen Mutanten

Die Zellen wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteinmischungspräparat; 1: Ausgangsprotein (F485); 2: Mutante F485W; 3: Mutante F485Y; 4: Mutante F485H; 5: Mutante F485V; 6: Mutante F485* (Deletion der C-terminalen Aminosäure des β -Fasses).

In den Spuren 1-6 der SDS-PAGE (**Abbildung 24 A**) und des Western Blots (**Abbildung 24 B**) war eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zu sehen. Diese entspricht der oberen der beiden Formen des Ausgangsproteins, die im Vorherigen als nicht außenmembranständig und nicht funktionell befunden wurde. Die Menge der Proteinform mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa war sehr stark erniedrigt. In den Spuren 2, 3, 4 und 6 war eine sehr dünne Bande detektierbar.

Die Linkerregion beinhaltet, neben Schnittstellen für weitere Proteasen wie Trypsin, auch eine Schnittstelle für die Protease OmpT. Der N-terminal der Schnittstelle gelegene Teil des Proteins (Teil des Linkers und Passagiers) würde nach korrektem Transport der Passagierdomäne auf die Oberfläche der *ompT*⁺ Zellen abgespalten werden und in den Überstand gelangen. Die errechnete Größe des durch den Verdau möglicherweise in den Überstand entlassenen Teils sollte ca. 10 kDa betragen. Die gefällten Proteine der Überstände wurden durch eine SDS-PAGE (12,5% Acrylamid) mit verkürzter Laufzeit aufgetrennt. Als Vergleich dienten genauso behandelte Proben eines *ompT* defizienten Stammes, *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3, der ebenfalls das Ausgangsprotein exprimiert.

Nur im Überstand der *E. coli* DH5 α (DE3)pET-SH3, die das Ausgangsprotein exprimierten (**Abbildung 25** Spur 8), war eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 15 kDa zu erkennen. Sie konnte mittels Antikörperfärbung markiert werden und lag darüber hinaus im Bereich des errechneten Molekulargewichts von 10 kDa. Im Überstand der Vergleichszellen UT5600(DE3)pET-SH3, die ebenfalls das Ausgangsprotein exprimierten, aber defizient für die Protease OmpT sind (**Abbildung 25** Spur 4), und in den Überständen von UT5600(DE3)pET-SH3 und DH5 α (DE3)pET-SH3, deren Proteinexpression nicht induziert worden war (**Abbildung 25** Spur 2 und 6), fehlte diese Bande. Dies ist auf dem noch vorliegenden Immunoblot besser zu erkennen als es mit Hilfe des Dokumentationssystems darstellbar war. In den Spuren 3 und 7, in denen die isolierten Außenmembranproteine von UT5600(DE3)pET-SH3 und DH5 α (DE3)pET-SH3, deren Proteinexpression induziert worden war, aufgetrennt wurden, war eine breite Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa zu sehen. Die Proteinformen mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 und 53 kDa konnten wegen der Verkürzung der Laufstrecke nicht adäquat von einander getrennt werden. Bei den Banden mit einem Molekulargewicht von 55 und 53 kDa, die in den Spuren 4 und 8, in denen

die Überstände aufgetrennt wurden, zu sehen sind, handelte es sich um Proteine, die aus den benachbarten Spuren 3 und 7 übergelaufen waren.

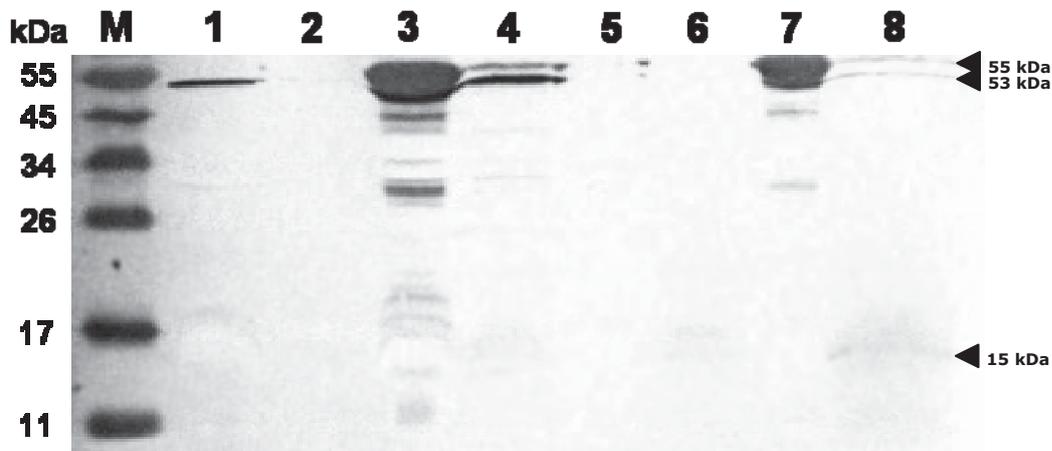


Abbildung 25: Nachweis des oberflächenständigen Teils des Ausgangsproteins im Überstand von *E. coli* DH5 α (DE3) nach Prozessierung durch die Protease OmpT

Die Zellen wurden angezogen und die Proteinexpression bei einer OD=0,5 induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und die löslichen Proteine der Überstände mit Trichloressigsäure gefällt. Die Proteine des Acrylamidgels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolyolphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch; 1: Ausgangsprotein, exprimiert in *E. coli* UT5600(DE3), ohne IPTG; 2: Ausgangsprotein, exprimiert in *E. coli* UT5600(DE3), ohne IPTG, Überstand; 3: Ausgangsprotein, exprimiert in *E. coli* UT5600(DE3), mit IPTG; 4: Ausgangsprotein, exprimiert in *E. coli* UT5600(DE3), mit IPTG, Überstand; 5: Ausgangsprotein, exprimiert in *E. coli* DH5 α (DE3), ohne IPTG; 6: Ausgangsprotein, exprimiert in *E. coli* DH5 α (DE3), ohne IPTG, Überstand; 7: Ausgangsprotein, exprimiert in *E. coli* DH5 α (DE3), mit IPTG; 8: Ausgangsprotein, exprimiert in *E. coli* DH5 α (DE3), mit IPTG, Überstand.

Im **Abbildung 24** konnte anhand der isolierten Außenmembranproteine gezeigt werden, dass die Menge der unteren Bande nach Expression in einem Stamm, der die Außenmembranprotease OmpT bildet, sehr stark erniedrigt war. Die Menge des Proteins in der oberen Bande unterschied sich nicht von der Menge, die nach einer Expression in einem *ompT* defizienten System wie *E. coli* UT5600(DE3), nachweisbar war (**Abbildung 12**). Sie wurde durch die oberflächenständige Protease OmpT nicht prozessiert. Als Nachweis der Oberflächenständigkeit zählt neben der Verdaubarkeit mit extern zugesetzten Proteasen auch die Markierbarkeit ganzer Zellen mit spezifisch gegen den Passagier oder benachbarte Epitope gerichteten Antikörpern. Die so markierten Zellen können durch eine Kopplung der Antikörper mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff im Durchflusszytometer detektiert werden, wie bereits in den Kapiteln 7.2.4, 7.2.5.2 und 7.2.5.4 beschrieben.

Eine Hauptkultur (80 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 800 µl der gewaschenen Übernachtskultur von UT5600(DE3)pET-SH3 beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 angezogen. Die Probe wurde in zwei Teile getrennt, ein Teil blieb unbehandelt (Negativkontrolle), die Proteinexpression im anderen Teil der Bakterien wurde induziert. Als zusätzliche Negativkontrolle dienten genauso behandelte *E. coli* DH5α(DE3) Zellen, die kein Plasmid trugen. Das Passagierepitop (PEYFK) wurde mit einem spezifischen Antikörper, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, markiert und die Bakterien im Durchflusszytometer analysiert.

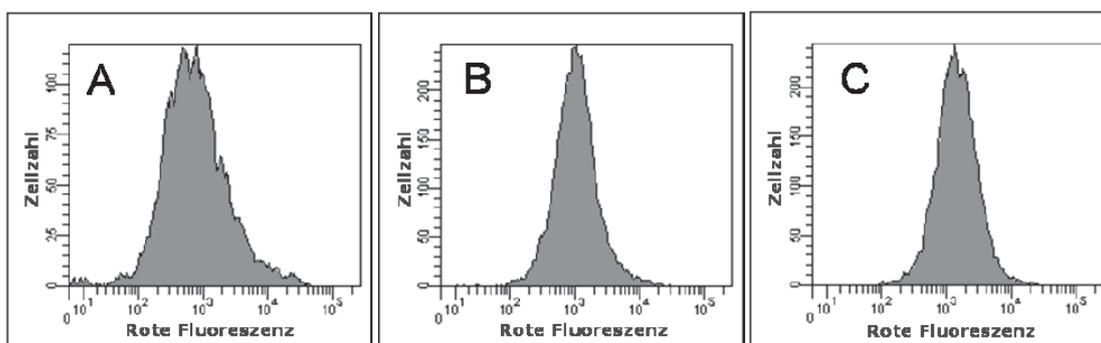


Abbildung 26: Nachweis der Prozessierung des Passagiers des Ausgangsproteins durch die außenmembranständige Protease OmpT in *E. coli* DH5α(DE3)

Die Bakterien wurden angezogen, die Proteinexpression induziert und das auf der Oberfläche präsentierte, lineare Epitop (PEYFK) mit einem Antikörper markiert, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. A: DH5α(DE3) als Negativkontrolle, mF = 1624; B: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren können, ohne IPTG, mF = 1442; C: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren können, mit IPTG, mF = 1643.

Es konnte keine signifikante Steigerung der mittleren Fluoreszenz der DH5α(DE3)pET-SH3, die das Ausgangsprotein exprimieren (**Abbildung 26 C**), im Vergleich zur Negativkontrolle (**Abbildung 26 A**), die kein Plasmid enthält, gemessen werden. Es befand sich kein spezifisch markierbares Epitop auf der Oberfläche, weder vor (**Abbildung 26 B**) noch nach (**Abbildung 26 C**) der Induktion der Proteinexpression. Die fehlende Fluoreszenz korreliert mit der durch Prozessierung durch OmpT stark herabgesetzten Menge der Proteinform mit einem Molekulargewicht von 53 kDa, die im Western Blot der isolierten Außenmembranproteine (**Abbildung 24**) von DH5α(DE3)pET-SH3 zu sehen war. Da die Proteinform mit einem Molekulargewicht von 55 kDa nicht prozessiert

wurde und ihre Menge unverändert blieb, war ein weiterer Nachweis erbracht, dass diese Form des Ausgangsproteins ihren Passagieranteil nicht funktionell auf der Oberfläche der Zellen präsentierte.

7.3.5 Unterschiedliche Löslichkeit der beiden Formen des Ausgangsproteins im Detergenz N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium

Um die Außenmembranen der Bakterienzellen anzureichern, wurde ein Protokoll benutzt, welches auf der von Hantke im Jahr 1981 (Hantke, 1981) publizierten Methode beruht. Dabei wird die Peptidoglykanschicht der Zellen durch Lysozym verdaut, der Ansatz mit weiteren Zusätzen wie DNase, Proteaseinhibitoren und dem Detergenz Triton X versetzt und die Kompartimente durch verschiedene Zentrifugationsschritte voneinander getrennt. Bei der hier verwendeten Methodik kommt am Ende der Auftrennung zusätzlich noch ein Waschschriff mit dem Detergenz N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium hinzu. Das Detergenz trennt die innere von der äußeren Membran (Filip *et al.*, 1973). Um die Proteinausbeute zu erhöhen, wurden die nach den Zentrifugationsschritten sedimentierten Membranproteine jedoch nur mit dem Detergenz geschwenkt. Es erfolgte keine komplette Resuspendierung des Sedimentes. Im Folgenden wurde nun untersucht, inwieweit eine vollständige Resuspendierung die Anreicherung der beiden Formen des Ausgangsproteins beeinflusst.

Eine Hauptkultur (80 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 800 µl einer Übernackkultur (gewaschen) von UT5600(DE3)pET-SH3 beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 inkubiert. Die Proteinexpression wurde induziert. Die Kultur wurde in zwei gleiche Teile geteilt und die Zellen abgeerntet. Das Sediment wurde in 1,5 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8 resuspendiert und nacheinander 0,1 ml 1 M Saccharose, 0,1 ml 10 mM EDTA, 0,1 ml Lysozym (10 mg/ml) und 3,2 ml Reinstwasser hinzu gegeben. Nachdem die Proben zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden waren, wurden 0,05 ml 100 mM PMSF, 0,01 ml Aprotinin (10 mg/ml), 5 ml Extraktionspuffer und 0,1 ml DNase I (1mg/ml) hinzugefügt und 30 Minuten auf Eis gelagert. Die Zelltrümmer wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 4500 rpm abgetrennt und die im Überstand enthaltenen Außenmembranen durch zehnminütiges, hochtouriges Zentrifugieren bei 18000 rpm sedimentiert. Die Rückstände beider Proben wurden mit 5 ml PBS + 1% N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium ver-

setzt. In Probe 1 wurde die Lösung nur über die Außenmembranen geschwenkt ohne diese aufzulösen. In Probe 2 wurde bis zur völligen Auflösung des Rückstandes gevortext. Beide Proben wurden erneut zehn Minuten bei 18000 rpm zentrifugiert, die Überstände abgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit 10%iger Trichloressigsäure ausgefällt. Mit Hilfe einer SDS-PAGE (10% Acrylamid) wurden die Proteine aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Das SDS-Gel wurde gefärbt, die Proteine der Membran, die das Epitop (PEYFK) enthielten, wurden nach Standardprotokoll mit spezifischen Antikörpern markiert.

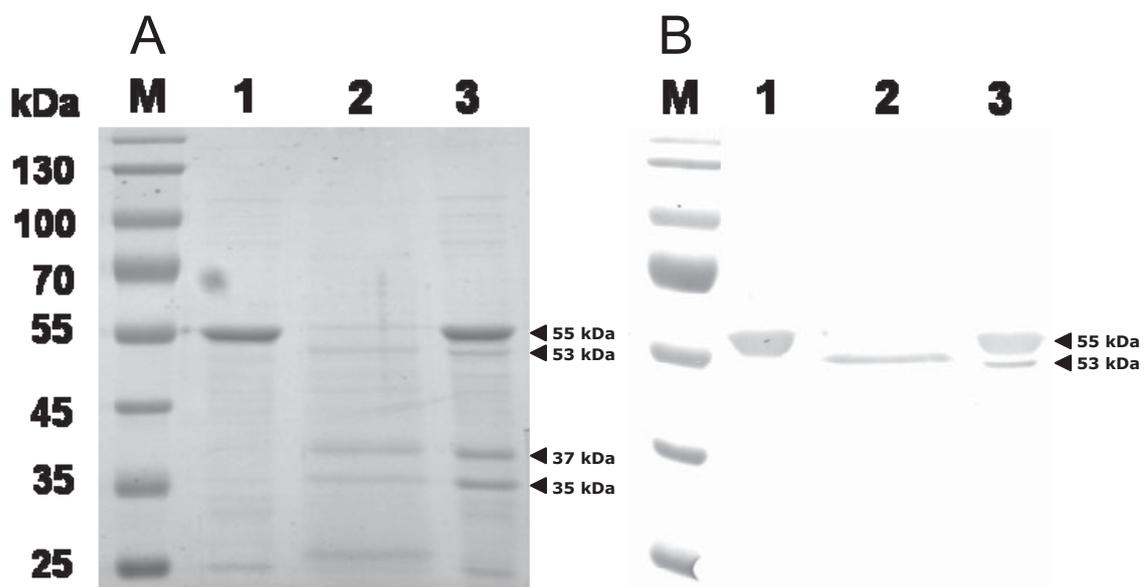


Abbildung 27: Unterschiedliche Löslichkeit der beiden Formen des Ausgangsproteins im Detergenz N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium

Die Bakterien wurden angezogen, die Proteinexpression bei einer OD=0,5 induziert und die Außenmembranproteine isoliert, wobei die Rückstände entweder in N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium gelöst wurden oder nicht. Die löslichen Proteine in den Überständen wurden mit 10%iger Trichloressigsäure gefällt. Alle Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteinmischung; 1: In N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium unlöslicher Rückstand; 2: In N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium lösliche Proteine, mit Trichloressigsäure gefällt; 3: Rückstand, mit N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium geschwenkt.

In Spur 3 der SDS-PAGE (**Abbildung 27 A**) und des Western Blots (**Abbildung 27 B**) wurden die Außenmembranproteine aufgetrennt, die nur im Detergenz geschwenkt wurden. Es waren beide Formen des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 und 53 kDa zu erkennen. Omp A und Omp F/C, die als Indikatorban-

den für außenmembranständige β -Fass Proteine dienen, sind in der SDS-PAGE (**Abbildung 27 A**, Spur 3) in einer Höhe von 35 und 37 kDa zu sehen. In Spur 1 der SDS-PAGE (**Abbildung 27 A**) und des Western Blots (**Abbildung 27 B**) wurden die Außenmembranproteine aufgetrennt, die nach einer vollständigen Solubilisierung im Detergenz im Rückstand verblieben. Es war nur die nicht funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zu erkennen. Omp A und Omp F/C, die als Indikatorbanden für außenmembranständige β -Fass Proteine dienen, sind in der SDS-PAGE (**Abbildung 27 A**, Spur 1) nicht in dieser Fraktion lokalisiert. In Spur 2 der SDS-PAGE (**Abbildung 27 A**) und des Western Blots (**Abbildung 27 B**) wurden die Außenmembranproteine aufgetrennt, die nach einer vollständigen Solubilisierung im Detergenz im Überstand verblieben und mit Trichloressigsäure ausgefällt werden konnten. Neben der funktionellen Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa, befanden sich in dieser Fraktion auch Omp A und Omp F/C mit einem apparenten Molekulargewicht von 35 und 37 kDa (**Abbildung 27 A**, Spur 2). Die funktionelle Form des Ausgangsproteins verhielt sich in Bezug auf ihre Löslichkeit in N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium exakt wie andere, in der Außenmembran von *E. coli* lokalisierte, β -Fass-Proteine. Sie war damit mit größter Wahrscheinlichkeit ebenfalls in der Außenmembran lokalisiert.

7.3.6 Massenspektrometrische Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenzen der beiden Formen des Ausgangsproteins

Mit Hilfe der Gel-Pro-Analyzer Software (MediaCybernetics, Bethesda, USA), die es ermöglicht ein SDS-Gel hinsichtlich der Lage, des Molekulargewichtes und der Dichte der Banden auszuwerten, wurde ein Molekulargewicht von 54,7 kDa für die obere, nicht funktionelle und von 52,3 für die untere, funktionelle Bande des Ausgangsproteins ermittelt. Das Molekulargewicht der beiden Proteine unterschied sich um 2,4 kDa. Das Molekulargewicht des Signalpeptides (AS 1-21), welches im Laufe des Transportprozesses abgespalten wird, beträgt 2,2 kDa. Es wurde vermutet, dass die nicht funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa nicht durch die Signalpeptidase prozessiert worden war. Zur Aufklärung der N-terminalen Sequenz wurde ein Außenmembranisolat von *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3 mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliantblau eingefärbt.

Beide Formen des Ausgangsproteins wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und dem Biologisch-Medizinischen.Forschungszentrum (BMFZ) Düsseldorf zur Analyse übergeben. Die Proben wurden im Gel mit Trypsin verdaut, die einzelnen Fragmente über eine Größenausschlusschromatographie voneinander getrennt und mit Hilfe der Massenspektrometrie (MALDI-TOF) identifiziert. Es konnte nur in der Probe, die der nicht funktionellen Form des Ausgangsproteins mit dem höheren apparenten Molekulargewicht entsprach, ein Fragment nachgewiesen werden, welches mit den ersten 26 Aminosäuren des Proteins übereinstimmt und damit das Signalpeptid enthielt. Diese Form des Ausgangsproteins wurde nicht durch die Signalpeptidase prozessiert. In der Probe, die das funktionelle Ausgangsprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa enthielt, fehlte diese Sequenz, so dass von einer Prozessierung ausgegangen werden kann. Die genaue Signalpeptidaseschnittstelle konnte mit der Methode nicht bestimmt werden.

7.3.7 Nachweis der Prozessierung und Lage der Signalpeptidaseschnittstelle in der funktionellen Form des Ausgangsproteins

Da die Signalpeptidaseschnittstelle mit Hilfe der Massenspektrometrie nicht aufgeklärt werden konnte, sollte eine Sequenzanalyse des N-terminalen Teils der Transportdomänen durch Edman-Abbau durchgeführt werden.

Eine Hauptkultur (40 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 400 µl einer Übernachtskultur (gewaschen) von UT5600(DE3)pET-SH3 beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 inkubiert. Um möglichst wenig der unprozessierten Form des Ausgangsproteins zu erhalten, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,006 mM Isopropylthiogalactosid eine Stunde bei 37°C und 200 rpm induziert. Die Außenmembranproteine der Zellen wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert. Für die Auftrennung des Isolates wurde ein Acrylamidgel (10%) gegossen und 2 Tage im Kühlschrank gelagert. Damit wurde eine vollständige Polymerisierung des Acrylamids gewährleistet, um eine Blockierung des N-Terminus zu vermeiden. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine wie in 6.3.9 beschrieben auf eine PVDF-Membran transferiert, angefärbt und die ersten fünf Aminosäuren analysiert. Durch die Bestimmung der Sequenz des für das Ausgangsprotein kodierenden Gens war bekannt, dass eine Mutation an der ursprünglichen Signal-

peptidaseschnittstelle (G21E) aufgetreten war. Durch das Programm SPScan ist es möglich, Schnittstellen der Signalpeptidase berechnen zu lassen. Es wurde eine Verschiebung der Schnittstelle um 2 Aminosäuren (AS) Richtung N-Terminus zwischen AS 19 und 20 vorhergesagt. Prinzipiell waren drei mögliche N-Termini denkbar, abhängig davon, ob und an welcher Stelle die Signalpeptidase geschnitten hatte (Sequenzen 2, 3, 4 in **Abbildung 28**). Schneidet die Signalpeptidase nicht, beginnt das Protein mit dem Aminosäureabfolge M-V-K-L-K. Schneidet das Enzym an seiner ursprünglichen Schnittstelle (nach AS 21), beginnt die Sequenz mit den Aminosäuren T-P-S-R-S. Schneidet die Peptidase an der neu errechneten Stelle (nach AS 19), erhält man ein Protein, das mit den Peptid H-E-T-P-S beginnt.

- 1) M V K L K F G V F F T V L L S S A Y A H E T P S R S
- 2) M V K L K
- 3) T P S R S
- 4) H E T P S
- 5) / E T / /

Abbildung 28: Mögliche Sequenzen des N-Terminus des Ausgangsproteins nach einem Edman-Abbau

1) Sequenz der ersten 26 Aminosäuren des unprozessierten Ausgangsproteins; 2) Sequenz die nach einem Edman-Abbau erwartet wird, wenn das Signalpeptid nicht abgespalten wurde; 3) Sequenz die nach einem Edman-Abbau erwartet wird, wenn das Signalpeptid an der ursprünglichen Position (nach AS 21) abgespalten wurde; 4) Sequenz die nach einem Edman-Abbau erwartet wird, wenn das Signalpeptid an der neu vorhergesagten Position (nach AS 19) abgespalten wurde; 5) Sequenz die durch den Edman-Abbau ermittelt wurde [(/) steht für einen Abbauzyklus, der kein eindeutiges Ergebnis brachte]. Die Signalpeptidase spaltet das Ausgangsprotein an der vorhergesagten, neuen Schnittstelle zwischen den Aminosäuren 19 und 20.

Zwei Aminosäuren, eine Glutaminsäure in Zyklus 2 und ein Threonin in Zyklus 3, konnten durch Edman-Abbau bestimmt werden. Die Reihenfolge entsprach den Aminosäuren 20 und 21 des Ausgangsproteins. Damit wurde das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse in 7.3.6, wonach das Signalpeptid der funktionellen Form des Ausgangsproteins abgespalten wurde, bestätigt. Die Signalpeptidaseschnittstelle konnte ermittelt werden: Sie lag vor der Aminosäure des ersten Zyklus des Edman-Abbaus. Das durch die Reaktion für diese Aminosäure erhaltene Signal war jedoch zu schwach für eine Auswertung. Da die Aminosäuren des zweiten und dritten

Zyklus (E, T) aufgeklärt worden waren, war es möglich, auf die Aminosäure des ersten Zyklus und den Beginn des prozessierten Proteins zurück zu schließen. Die Sequenz begann mit Aminosäure 19 des unprozessierten Autotransporters, einem Histidin. Damit konnte die berechnete Verschiebung der Signalpeptidaseschnittstelle im Ausgangsprotein bestätigt werden.

7.3.8 Einfluss der Signalpeptidaseschnittstelle auf die Prozessierung des Ausgangsproteins mit einem anderen Passagier

Es konnte in den vorhergehenden Kapiteln gezeigt werden, dass bei Anzucht und Proteinexpression unter Standardbedingungen zwei unterschiedliche Formen des Ausgangsproteins gebildet werden. Die untere Bande mit einem Molekulargewicht von 53 kDa, ist funktionell und ihr Passagierepitop wird auf der Oberfläche der Bakterien präsentiert. Die obere Bande mit einem Molekulargewicht von 55 kDa wurde nicht durch die Signalpeptidase prozessiert und liegt in einer nicht funktionellen Form vor. Ihr Passagieranteil erreicht die Oberfläche nicht. Neben dem Plasmid pET-SH3, das für das Ausgangsprotein mit einem Epitop (PEYFK) als Passagier kodiert, finden im Arbeitskreis noch andere, nahe verwandte Plasmide Verwendung, die auf dem induzierbaren Vektor pET-11d (Novagen, Madison, USA) beruhen. Das Plasmid pKP007, kodiert für eine Proteinvariante, die sich kaum vom Ausgangsprotein unterscheidet. Lediglich Aminosäure 21, die ursprüngliche Signalpeptidaseschnittstelle, befindet sich im Gegensatz zum Ausgangsprotein in ihrem natürlichen Zustand (G21). Neben dem Epitop (PEYFK) ist noch ein weiteres Peptid (KLDK) als Passagier enthalten.

Eine Hauptkultur (80 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 800 µl einer gewaschenen Übernachtskultur von *E. coli* UT5600(DE3)pKP007 inokuliert und angezogen. Die Probe wurde in zwei gleiche Hälften geteilt und die Proteinexpression in einem Teil induziert. Die andere Hälfte blieb unbehandelt (Negativkontrolle). Die Außenmembranproteine wurden isoliert, mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörper und Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper markiert.

In Spur 2 und 3 des Western Blots (**Abbildung 29**) war neben einer Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa eine weitere Bande mit einem apparenten

Molekulargewicht von 53 kDa detektierbar. Dies entsprach eher dem errechneten Molekulargewicht (50 kDa) der Variante des Ausgangsproteins mit einem zusätzlichen Tetrapeptid als Passagier. Um die beiden Proteinformen voneinander zu trennen, musste, wie bei der Auftrennung des ursprünglichen Ausgangsproteins, die Probe ausreichend verdünnt vorliegen (**Abbildung 29** Spur 3) und die Laufstrecke verlängert werden.

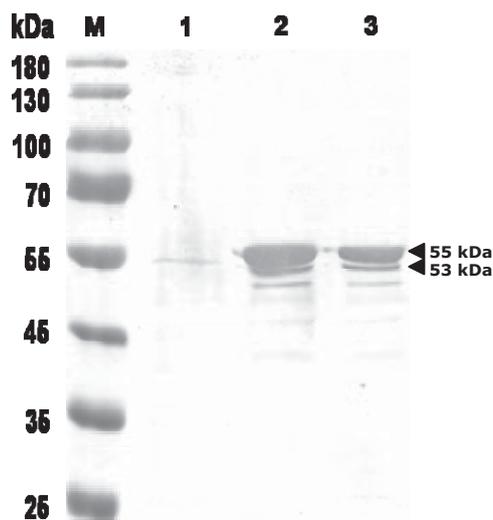


Abbildung 29: Nachweis der beiden unterschiedlichen Prozessierungsvarianten für ein Ausgangsprotein mit der ursprünglichen Signalpeptidaseschnittstelle und einem anderen Passagier

Die Zellen wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (12,5% Acrylamid) aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch; 1: Ausgangsproteins mit der ursprünglichen Signalpeptidaseschnittstelle und einem zusätzliches Tetrapeptid als Passagier, ohne IPTG; 2: Ausgangsproteins mit der ursprünglichen Signalpeptidaseschnittstelle und einem zusätzliches Tetrapeptid als Passagier, mit IPTG, 4,5µl; 3: Ausgangsproteins mit der ursprünglichen Signalpeptidaseschnittstelle und einem zusätzliches Tetrapeptid als Passagier, mit IPTG, 3,5µl.

Es kam auch in Konstrukten, die die ursprüngliche Signalpeptidaseschnittstelle nach Aminosäure 21 und eine veränderte Passagierdomäne enthalten, nach Stimulierung der Proteinexpression zur Ausbildung von zwei unterschiedlichen Proteinformen, die sich in ihrem Molekulargewicht unterschieden. Die Entstehung der beiden Proteinformen war unabhängig von der Signalpeptidaseschnittstelle, wie schon für die Mutante E21G in Kapitel 7.1.4 nachgewiesen wurde. Auch eine Erweiterung der Passagierdomäne im Vergleich zum Ausgangsprotein beeinflusste die Prozessierung des gebildeten Proteins nicht.

7.3.9 Bestimmung der Anzahl oberflächenständiger Passagiermoleküle

Die Zahl der mittels Autodisplay auf der Oberfläche von *E. coli* präsentierten Moleküle konnte mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Jose *et. al.* ermittelten 2001 über die Umsetzung eines Substrates durch oberflächenständiges, bovines Adrenodoxin eine Zahl von $1,5 \times 10^5$ Molekülen pro Zelle (Jose *et al.*, 2001). 2004 wurde von Jose und von Schwichow diese Anzahl durch eine andere Methode bestätigt ($1,8 \times 10^5$ Moleküle pro Zelle)(Jose und von Schwichow, 2004a). Dabei wurde ein mit dem Passagiermolekül auf die Oberfläche transloziertes artifizielles Cystein mit einem fluoreszierenden Maleinimid-Derivat gekoppelt. Die mittlere Fluoreszenz der Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt und mit der mittleren Fluoreszenz von Partikeln mit einer definierten Anzahl von fluoreszierenden Molekülen auf der Oberfläche verglichen.

Zur Beschichtung eines Biosensors auf Basis der „Surface Plasmon“ Technologie wurden *E. coli* Zellen konstruiert, die mittels Autodisplay die Z-Domäne von Protein A aus *Staphylococcus aureus* auf der Oberfläche präsentierten (Jose *et al.*, 2008). Protein A, bzw. seine Antikörper bindende Z-Domäne, wird zur Immobilisierung von Antikörpern in einer kontrollierten Orientierung verwendet. Dabei bindet sie an die konstante Region (F_c-Region) von IgG-Antikörpern (Nilsson *et al.*, 1987). Die Bindung erfolgt dabei Spezies spezifisch unterschiedlich stark (Surolia, 1982). Es wurde ein Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (FITC gekoppelt, Rockland Inc., Gilbertsville, USA) gewählt. Er gewährleistete eine hohe Affinität des IgG-Antikörpers an die bindende Domäne und ermöglichte über die Ermittlung der Fluoreszenz im Durchflusszytometer die Bestimmung der Antikörpermenge, bei der die komplette Oberfläche aller Zellen mit Antikörpern abgesättigt ist.

Eine Hauptkultur von UT5600(DE3)pET-Z18-3, die die Z-Domäne auf ihrer Oberfläche tragen können, wurde bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 inkubiert und die Proteinexpression bei 29 °C induziert. Die OD wurde auf 0,5 eingestellt, sechs Aliquots mit jeweils 1 ml Zellsuspension hergestellt und mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 µg, 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg, 2 µg) des Antikörpers inkubiert. Als Negativkontrolle dienten genauso behandelte UT5600(DE3), die kein Expressionsplasmid enthielten. Die Bakterien wurden im Durchflusszytometer (FACS) analysiert. Die Außenmembranproteine der Zellen wurden isoliert und mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt.

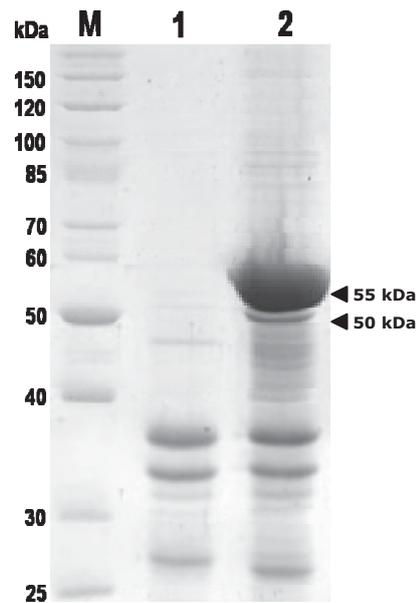


Abbildung 30: Nachweis beider Proteinformen in *E. coli* UT5600(DE3), die die Z-Domäne auf der Oberfläche exprimieren

Die Zellen wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch; 1: Ausgangsprotein mit der Z-Domäne als Passagier, ohne IPTG; 2: Ausgangsprotein mit der Z-Domäne als Passagier, mit IPTG.

In Spur 1 in **Abbildung 30** wurden die Außenmembranproteine der Zellen aufgetrennt, deren Proteinexpression nicht induziert worden war. Wie erwartet konnte keine Bande im Bereich des errechneten Molekulargewichtes detektiert werden. Nach Induktion der Proteinexpression (**Abbildung 30**, Spur 2) sind zwei Proteinformen mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 und 50 kDa zu sehen, wie sie auch schon für das Ausgangsprotein mit einem Epitop als Passagier nachgewiesen werden konnten. Beim Autodisplay der Z-Domäne kommt es nach Stimulierung der Proteinexpression höchstwahrscheinlich ebenfalls zu den beiden unterschiedlichen Prozessierungsvarianten, von denen nur die mit dem niedrigeren Molekulargewicht und der geringeren Menge ihre Passagierdomäne auf der Außenmembran präsentierte.

In **Abbildung 31** werden beispielhaft drei FACS-Messungen dargestellt. UT5600(DE3), die kein Expressionsplasmid enthalten und deshalb keine Z-Domäne auf der Oberfläche präsentieren konnten, zeigten nach Inkubation mit 2 μ g Antikörper (**Abbildung 31 A**) eine mittlere Fluoreszenz von 107. Verglich man diese mittlere Fluoreszenz mit der der Zellen, die die Z-Domäne auf der Oberfläche trugen und nicht mit Antikörper markiert wurden (**Abbildung 31 B**), so war kein Unterschied detektierbar.

Die Zellen, die die Z-Domäne auf der Oberfläche trugen und mit 1 µg Antikörper markiert worden waren, wiesen im Mittel eine zehnfache Erhöhung der Fluoreszenz auf (**Abbildung 31 C**). Die Z-Domäne von Protein A konnte also mittels Autodisplay auf der Oberfläche der *E. coli* Zellen präsentiert und mit Antikörpern gekoppelt werden.

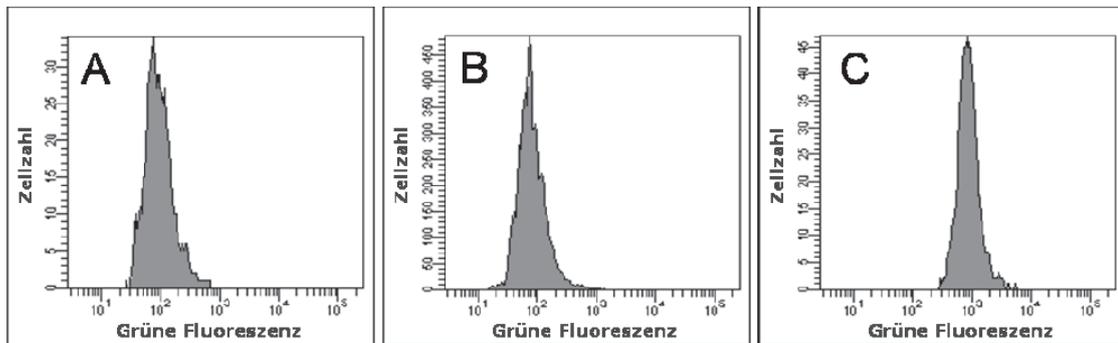


Abbildung 31: Oberflächenständigkeit der Z-Domäne

Die Bakterien wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die auf der Oberfläche präsentierte Z-Domäne wurde mit einem Antikörper markiert, der mit FITC gekoppelt war. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. A: UT5600(DE3) als Negativkontrolle, markiert mit 2 µg Antikörper, mF = 107; B: Zellen, die die Z-Domäne exprimieren, ohne Antikörper, mF = 98; C: Zellen, die die Z-Domäne exprimieren, markiert mit 1 µg Antikörper, mF = 1137.

Trug man die mittlere Fluoreszenz aller Ansätze gegen die zur Markierung verwendete Antikörpermenge auf, so zeigte sich ein Anstieg der Fluoreszenz bis zu einer Menge von 1 µg pro Markierungsansatz (**Abbildung 32**, ↓). Wurde die Antikörpermenge bis auf 2 µg erhöht, steigerte sich die Fluoreszenz nicht mehr. Es kann angenommen werden, dass nach Zugabe von 1 µg Antikörper die komplette Oberfläche aller Zellen, die im Markierungsansatz enthalten waren, mit Antikörpern abgesättigt war.

Gemäß der Annahme, dass jede oberflächenständige Z-Domäne einen Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper gebunden hatte, ist die Anzahl gebundener Antikörper gleich der Anzahl oberflächenständiger Z-Domänen. Da ein IgG-Antikörper ein geschätztes Molekulargewicht von 150.000 g/mol hat, wurden im Markierungsansatz mit 1 µg Antikörper $(6,023 \times 10^{23} / \text{mol} / 150.000 \text{ g/mol}) / 10^6 \times 1 \mu\text{g} = 4,02 \times 10^{12}$ Moleküle Antikörper gebunden. Zur Bestimmung der pro Zelle gebundenen Anzahl an Antikörpern wurde die Zellzahl ermittelt. Dafür wurden geeignete Verdünnungen der im Durchflusszytometer vermessenen Proben auf LB-Platten ausplattiert, die als Selektionsmarker Ampicillin

enthielten. Die Platten wurden im Brutschank bei 37°C über Nacht inkubiert und die Kolonien am nächsten Tag ausgezählt.

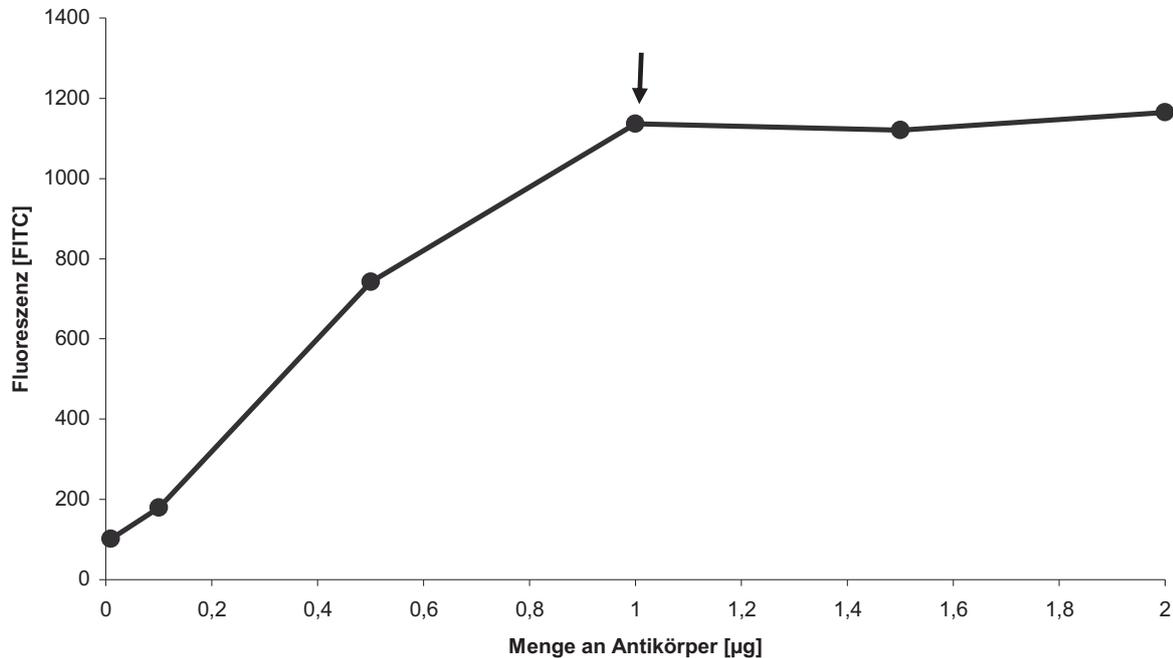


Abbildung 32: Quantifizierung der oberflächenständigen Z-Domänen mittels Antikörpertitration

Die Bakterien wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die auf der Oberfläche präsentierten Z-Domänen wurden mit einem Antikörper markiert, der mit FITC gekoppelt war. Die mittlere Fluoreszenz der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt und gegen die Antikörpermenge im Markierungsansatz aufgetragen.

Es wurde eine Zellzahl von $1,78 \times 10^7$ pro Markierungsansatz ermittelt. Folglich wurden $4,02 \times 10^{12}$ Antikörper-Moleküle / $1,78 \times 10^7$ Zellen = 225.000 Antikörper-Moleküle pro Zelle gebunden. Die in früheren Versuchen ermittelte Größenordnung von ca. 10^5 Molekülen, die mit Hilfe des Autodisplay auf der Oberfläche eines Bakteriums präsentiert werden können, konnte bestätigt werden. Dabei entsprachen die 10^5 funktionell an der Oberfläche präsentierten Passagiere der prozessierten Proteinvariante im SDS-Gel in **Abbildung 30**, die ein Molekulargewicht von 50 kDa zeigte und in geringerer Menge vorhanden war.

7.4 Optimierung der Expression der funktionellen Variante des Ausgangsproteins

Um ein Protein mit Hilfe des Autodisplays auf die Oberfläche von *E. coli* zu transportieren, muss ein Mechanismus durchlaufen werden, dessen einzelne Schritte noch nicht endgültig aufgeklärt sind (Pohlner *et al.*, 1987; Veiga, 2002; Jose und Meyer, 2007; Tommassen, 2007). Am Anfang dieses Geschehens steht immer die Bildung einer messenger-RNA, die alle Informationen für das Vorläuferprotein enthält, und an den Ribosomen translatiert wird. Die Entstehung dieser mRNA kann durch die Wahl des Expressionssystems beeinflusst werden. Es fanden zwei prinzipiell unterschiedliche Vektorsysteme Anwendung. Im ersten System steht die Bildung der mRNA unter der Kontrolle eines konstitutiven, im zweiten System unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors (Bolivar *et al.*, 1977; Studier und Moffatt, 1986; Watson, 1988; Klauser *et al.*, 1990; Studier, 1991). Das bedeutet für die Zellen, dass im ersten Fall während der kompletten Anzucht das Protein von Interesse gebildet wird. Unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors erfolgt die Proteinexpression erst nach Zugabe eines spezifischen Induktors, in diesem Fall IPTG. Das Protein von Interesse wird nur in einem definierten Zeitraum gebildet, die Zelle hat während der Zeit, in der die Proteinexpression nicht induziert ist, keinen Nachteil gegenüber Zellen, die kein Fremdprotein produzieren. Eine negative Selektion der Expressionsstämme wird erschwert (Studier und Moffatt, 1986). Die Zelle wird ganz unterschiedlich belastet, was wiederum die Bildung des funktionellen Proteins beeinflussen kann (Terpe, 2006). Es konnte von Maurer nachgewiesen werden, dass eine konstitutive Induktion der Proteinexpression zur Bildung einer funktionellen Proteinform führt (Maurer *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die induzierbare Induktion die Entstehung von zwei unterschiedlichen Proteinformen nach sich zieht, von denen nur eine funktionell ist. Es war nahe liegend zu untersuchen, ob durch Änderung der Bedingungen während der Induktion die Bildung einer nicht funktionellen Proteinform im induzierbaren System verringert oder verhindert werden kann.

7.4.1 Vergleich der konstitutiven mit der induzierten Proteinexpression

Im Plasmid pJM1013 steht die Expression des Autotransporterfusionsgens, das für das Ausgangsprotein kodiert, unter der Kontrolle des konstitutiven P_K -Promotors (Klauser

et al., 1990). Es diente als Matrize für das Plasmid pET-SH3, in welchem die Expression des Autotransporterfusionsgens unter der Kontrolle des induzierbaren T7*lac*-Promotors steht (Studier *et al.*, 1990; Dubendorff und Studier, 1991). Aus den durchgeführten Sequenzierungen ist bekannt, dass sich beide dennoch in der Basenabfolge unterscheiden. Es wurden zwei Nukleotidaustausche gefunden, die zu zwei Aminosäureaustauschen (I2V, R1212S) im Ausgangsprotein führen, das vom Plasmid pET-SH3 kodiert wird. Deshalb ist es sinnvoll, das Autotransporterfusionsgen aus pJM1013 erneut zu amplifizieren und in das Vektorrückgrat, das eine induzierte Proteinexpression ermöglicht (pET-System), zu transferieren. Somit hatte man in beiden Expressionssystemen die identische Sequenz vorliegen, was einen direkten Vergleich ermöglichte. Um das entsprechende Fusionsgen aus pJM1013 zu erhalten, wurde es mit den Primern SH015, welcher ans 5'-Ende eine NcoI-Schnittstelle anfügt, und SH016, welcher ans 3'-Ende eine BclI-Schnittstelle anfügt, amplifiziert. Das 1450 bp lange Amplikon wurde mit beiden Restriktionsendonukleasen verdaut und aufgereinigt. Als Akzeptorplasmid sollte pET11d (Invitrogen, Carlsbad, USA) dienen, welches als pET112 in einer modifizierten und für unsere Belange geeigneten Form zur Verfügung stand (Handel, 2003). In diesem Derivat waren zwei Restriktionsschnittstellen entfernt (XbaI, BglII) entfernt worden. Das Plasmid pET112 wurde mit NcoI und BamHI geschnitten, wobei ein 36 bp großes Stück aus der Multiple Cloning Site heraus fiel. BamHI besitzt kompatible Enden zu BclI. Nach erfolgter Verknüpfung kann die entstandene Sequenz durch keines der beiden Enzyme geschnitten werden. Nach Dephosphorylierung und Aufreinigung wurde das 5638 bp große Fragment mit dem geschnittenen PCR-Fragment ligiert. Es entstand das Plasmid pEW007. Durch Verwendung des Primers SH015 und Einfügen der Restriktionsschnittstelle NcoI kam es zu einer Änderung der Basensequenz, so dass das kodierte Protein an Position 2 an Stelle eines Isoleucins Valin besitzt. Da sich beide Aminosäuren strukturell und in ihren Eigenschaften minimal unterscheiden, wird sich ein Tausch kaum auf den Transport des Proteins auswirken.

Das Plasmid pEW007 wurde in elektrokompetente *E. coli* UT5600(DE3) Zellen eingebracht. Eine Hauptkultur (40 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 400 µl einer Übernachtskultur von UT5600(DE3)pEW007 beimpft und nach Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,5 wurde die Proteinexpression induziert. Die Außenmembranproteine wurden nach einem modifizierten Protokoll aus-

gehend von der Methode nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert. *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3 und *E. coli* UT5600pJM1013 dienten als Vergleich und wurden genauso behandelt. Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und das Passagierepitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert.

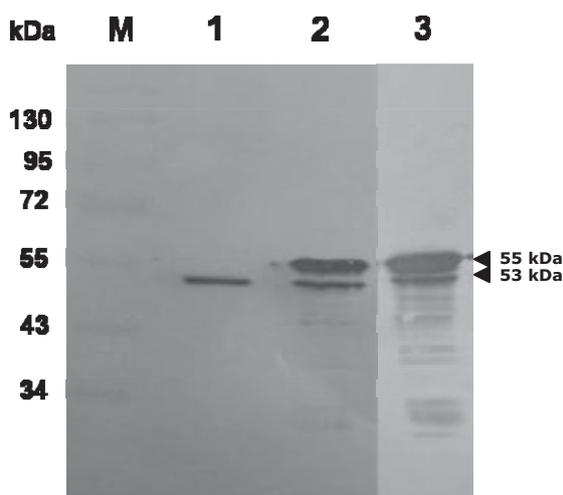


Abbildung 33: Einfluss einer konstitutiven Proteinexpression auf die Expressionsstärke und die Membranständigkeit des Ausgangsproteins

Die Zellen wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteinmischung; 1: Variante des Ausgangsproteins, nach konstitutiver Expression; 2: Ausgangsprotein, nach induzierter Expression, 3: Variante des Ausgangsproteins, nach induzierter Expression.

In allen Außenmembranproteinisolaten (**Abbildung 33**, Spur 1-3) konnten die prozessierte und funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa detektiert werden. Daneben war in den Spuren 2 und 3, in denen die Außenmembranproteine der Zellen aufgetrennt wurden, deren Proteinexpression induziert worden war, eine weitere Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zu sehen, die der nicht funktionellen Proteinform entsprach. In Spur 1, in der das Ausgangsprotein nach konstitutiver Proteinexpression aufgetrennt wurde, war diese Bande nicht zu sehen. Es konnte nur funktionelles und prozessiertes Protein nachgewiesen werden. Die Stärke der funktionellen Bande ist in allen Spuren ähnlich. Die Bandenstärke der nicht funktionellen Proteinform des Ausgangsproteins übersteigt sie um ein Vielfaches. Durch die Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG für eine

Stunde bei 37 °C wird die Proteinexpression stark erhöht. Dabei wird hauptsächlich eine Proteinform gebildet, die unprozessiert und nicht funktionell ist. Die Menge der funktionellen Proteinform bleibt annähernd gleich, unabhängig davon, ob die Expression unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors steht.

Die Stämme UT5600(DE3)pET-SH3, UT5600(DE3)pEW007 und UT5600pJM1013 wurden wie oben beschrieben angezogen und das oberflächenständige Passagierepitop zuerst mit einem Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörper und dann mit einem Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper (gekoppelt mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff) markiert.

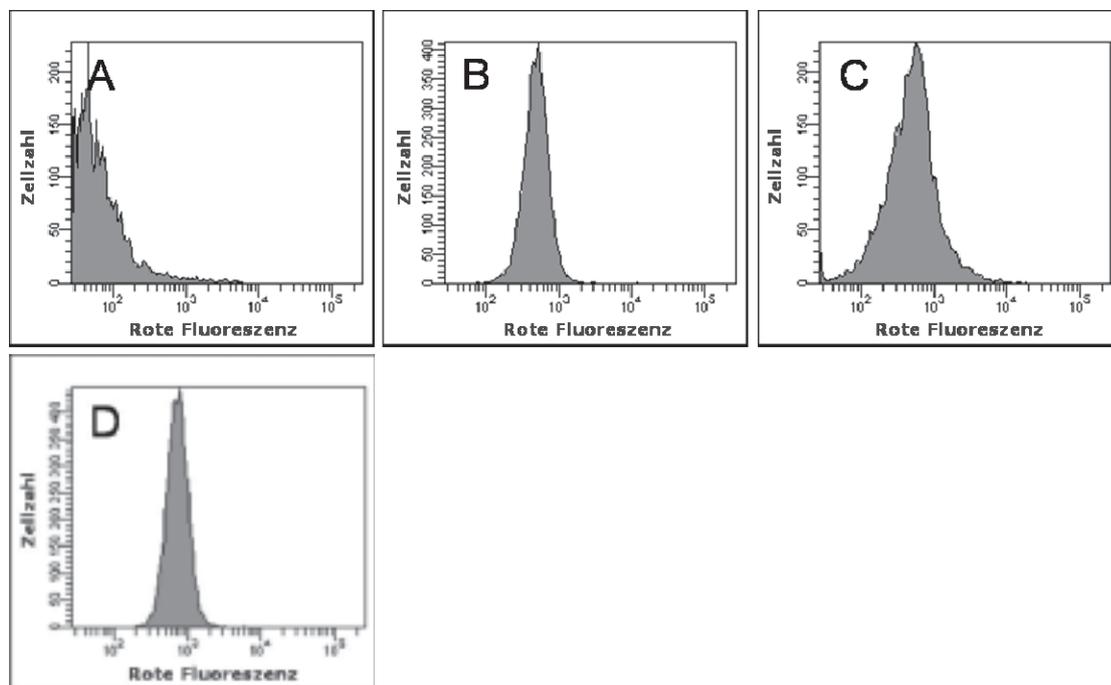


Abbildung 34: Oberflächenständigkeit eines Epitops als Passagierdomäne des Ausgangsproteins nach konstitutiver und induzierter Proteinexpression

Die Bakterien wurden angezogen, die Proteinexpression induziert und das auf der Oberfläche präsentierte, lineare Epitop (PEYFK) mit einem Antikörper markiert, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. A: UT5600(DE3) als Negativkontrolle, mF = 112; B: Zellen, die das Ausgangsprotein nach induzierter Proteinexpression exprimieren, mF = 570; C: Zellen, die eine Variante des Ausgangsproteins (R1212) nach induzierter Proteinexpression exprimieren, mF = 710; D: Zellen, die eine Variante des Ausgangsproteins (I2, R1212) nach konstitutiver Proteinexpression exprimieren, mF = 940.

Die Bakterien, die das Ausgangsprotein (S1212) nach induzierter Proteinexpression exprimierten (**Abbildung 34 B**) zeigten eine Steigerung der mittleren Fluoreszenz um das fünffache im Vergleich zur Negativkontrolle, die kein Expressionsplasmid enthielt

(**Abbildung 34 A**), die Variante des Ausgangsproteins (R1212) um das sechsfache (**Abbildung 34 C**). Wurden die Werte mehrerer Messungen gemittelt, näherten sich die mittleren Fluoreszenzen der Zellen, die die beiden Ausgangsproteine exprimieren, aneinander an. Es konnte kein Unterschied detektiert werden. Die Bakterien, die die Variante des Ausgangsproteins nach konstitutiver Expression exprimierten (**Abbildung 34 D**), zeigten ebenfalls eine Steigerung der mittleren Fluoreszenz um das achtfache im Vergleich zur Negativkontrolle (**Abbildung 34 A**). Wurden die Werte mehrerer Messungen gemittelt, zeigten sie eine Steigerung der mittleren Fluoreszenz um 45%, verglichen mit den Zellen, die das Ausgangsprotein oder seine Variante nach induzierter Proteinexpression exprimierten. Die Bakterienzellen trugen nach konstitutiver Proteinexpression mehr markierbare Epitope auf der Oberfläche.

7.4.2 Einfluss eines weiteren, induzierbaren Expressionssystems auf die beiden Varianten des Ausgangsproteins

Im vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, dass Expression der nicht funktionellen Form des Ausgangsproteins mit dem zur Proteinexpression gewählten System zusammenhängt. Mit pCOLA-Duet-1 (Novagen, Madison, USA) stand ein weiteres Expressionssystem zur Verfügung, das auch durch Stimulation mit IPTG zur induzierbaren Proteinexpression befähigt ist (Zverev und Khmel, 1985). Im Unterschied zu pET-11d, auf dem alle vorher beschriebenen Konstrukte beruhen, deren Proteinexpression induziert wurde, besitzt pCOLA-Duet-1 das Kanamycin-Resistenzgen anstelle des Ampicillin-Resistenzgen und ist um 1955 bp kleiner. Das Plasmid pCOLA-Duet-1 besitzt den ColA origin of replication (ori) anstelle des ColE1 ori, der in pET-11d enthalten ist. Die Zahl der Plasmidkopien pro Zelle wurde von Novagen für das Plasmid pCOLA-Duet-1 mit 20-40 angegeben und war damit geringfügig kleiner als die Kopienzahl die für pET-11d angegeben wurde (mind. 40).

Das Plasmid pAG005 (3719 bp) ist ein Derivat von pCOLA-Duet-1, welchem die XhoI Schnittstelle an Position bp 354 und die AgeI Schnittstelle an Position bp 566 fehlt. Es wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI (bp 69) und BlnI (bp 451) verdaut, durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Bande von Interesse (3338 bp) ausgeschnitten. Das Plasmid pET-SH3, das für das Ausgangsprotein kodiert, wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI (bp 7100) und BlnI (bp 1515) verdaut, um das komplette

Gen, welches für die Transportdomänen kodiert (1456 bp) heraus zu schneiden. Die beiden Fragmente wurden durch eine T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Es entstand das Plasmid pEW009, das in elektrokompente *E. coli* UT5600(DE3) eingebracht wurde.

Die Stämme *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3 und *E. coli* UT5600(DE3)pEW009 wurden angezogen, ihre Proteinexpression induziert und jeweils 1 ml jeder Kultur mit einer OD von 0,6 wurde für eine Analyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Eis gestellt. Aus der restlichen Kultur wurden die Außenmembranproteine isoliert und mit Hilfe einer SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Proteine eines SDS-Gels wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und zuerst mit einem Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörper und danach mit einem Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper inkubiert. Nach Zugabe einer Substratlösung bildete sich an den Stellen, wo die Antikörper gebunden hatten, ein rotvioletter Farbstoff. Als Negativkontrolle dienten genauso behandelte UT5600(DE3)pAG005, die ein auf Basis des pCOLA-Duet-1 System konstruiertes Plasmid trugen, das kein Autotransporterfusionsgen enthält.

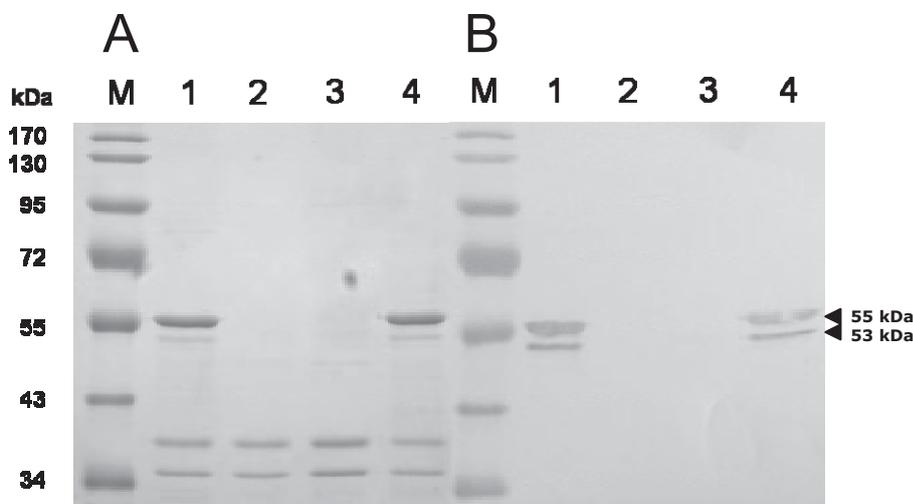


Abbildung 35: Einfluss eines anderen induzierbaren Expressionssystems auf Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins

Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch; 1: Ausgangsprotein, Expressionssystem auf Basis des pET-11d, mit IPTG; 2: UT5600(DE3)pAG005 als Negativkontrolle, mit IPTG; 3: Ausgangsprotein, Expressionssystem auf Basis des pCOLA-Duet-1, ohne IPTG; 4: Ausgangsprotein, Expressionssystem auf Basis des pCOLA-Duet-1, mit IPTG.

In den Spuren 1 und 4 des SDS-Gels (**Abbildung 35 A**) und des Western Blots (**Abbildung 35 B**) war sowohl die prozessierte und funktionelle Form mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa, wie auch die unprozessierte, nicht funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa detektierbar. In den Spuren 2 und 3 der **Abbildung 35**, in denen die Außenmembranproteine der Negativkontrollen, deren Proteinexpression nicht induziert worden war, aufgetrennt wurden, konnten diese Proteine nicht gefunden werden. Das pCOLA-Duet-1 System zeigte im Gegensatz zum pET-11d System keine Basalexpression. Die Menge und der Prozessierungsgrad des Ausgangsproteins waren in den Spuren 1 (pET11-d Expressionssystem) und 4 (pCOLA-Duet-1 Expressionssystem) ähnlich. Der Tausch des Expressionssystems änderte die Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins nicht.

Die für die durchflusszytometrische Analyse auf Eis gestellten Zellen wurden mit einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und danach mit einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers inkubiert. Die mittlere Fluoreszenz der Bakterien wurde im Durchflusszytometer analysiert.

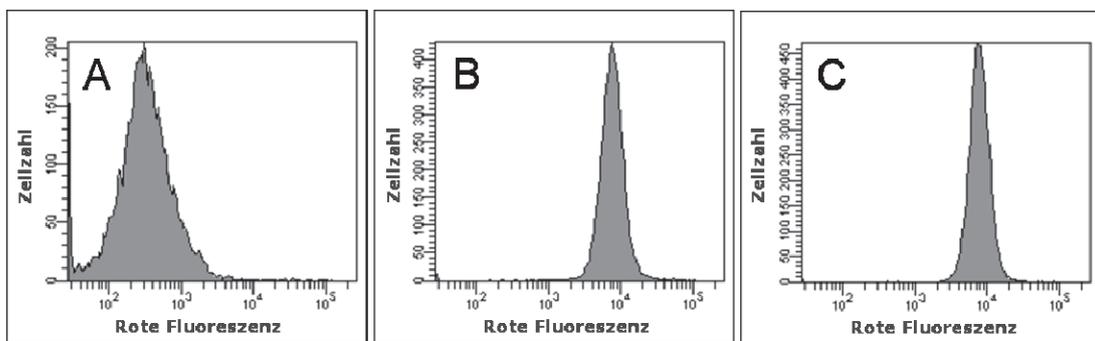


Abbildung 36: Einfluss eines anderen induzierbaren Expressionssystems auf die Oberflächenständigkeit eines Passagiers des Ausgangsproteins

Die Bakterien wurden angezogen, die Proteinexpression induziert und das auf der Oberfläche präsenzierte, lineare Epitop (PEYFK) mit einem Antikörper markiert, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. A: UT5600(DE3) als Negativkontrolle, mF = 871; B: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren (Expressionssystem auf Basis von pET-11d), mF = 8310; C: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren (Expressionssystem auf Basis von pCOLA-Duet-1), mF = 8199; C.

Die Zellen, deren Expressionssystem auf Basis des pET-11d Systems beruht, (**Abbildung 36 B**) und die Zellen, deren Expressionssystem auf pCOLA-Duet-1 beruht,

(**Abbildung 36 C**) zeigten eine fast identische Erhöhung der mittleren Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Expressionsplasmid (**Abbildung 36 A**). Es befanden sich damit gleich viele Epitope auf der Oberfläche beider Stämme, unabhängig vom Vektorrückgrat des verwendeten Plasmides und der Anzahl der Plasmidkopien pro Zelle. Die Expressionssysteme pET-11d und pCOLA-Duet-1 können gegeneinander getauscht werden, ohne die Translozierung der Passagierepitope des Ausgangsproteins zu beeinflussen.

7.4.3 Einfluss der Induktionstemperatur auf die Expression und Integration der beiden Formen des Ausgangsproteins

Die optimale Induktionstemperatur ist nicht für alle Bakterienstämme und Zielproteine gleich und sollte im Idealfall individuell ermittelt werden (Novagen, 2003; Terpe, 2006). Im Standardprotokoll waren zwei unterschiedliche Temperaturen in Gebrauch, 29°C und 37°C. Es sollte untersucht werden, ob durch die Änderung der Induktionstemperatur die Expression der funktionellen Variante des Ausgangsproteins bevorzugt werden kann.

Eine Hauptkultur (80 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 800 µl einer Übernachtskultur von UT5600(DE3)pET-SH3 beimpft, bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 inkubiert und in zwei gleiche Volumen geteilt. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM Isopropylthiogalactosid bei 29 °C bzw. 37 °C eine Stunde induziert. Jeweils 1 ml jeder Kultur mit einer OD von 0,6 wurde für eine durchflusszytometrische Analyse auf Eis gestellt. Die Außenmembranproteine wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert und mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Nachdem die Proteine eines SDS-Gels auf eine PVDF-Membran transferiert worden waren, wurde das Passagierepitop mit einem Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörper und einem Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper gekoppelt.

Sowohl in Spur 1 wie auch in Spur 2 des SDS-Gels (**Abbildung 37 A**) und des Western Blots (**Abbildung 37 B**) konnte die prozessierte, funktionelle Form mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa neben der nicht funktionellen, unprozessierten Form des Ausgangsproteins (55 kDa) gefunden werden. Durch eine Änderung der Induktionstemperatur von 37 °C auf 29 °C konnte keine Optimierung der Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins erreicht werden.

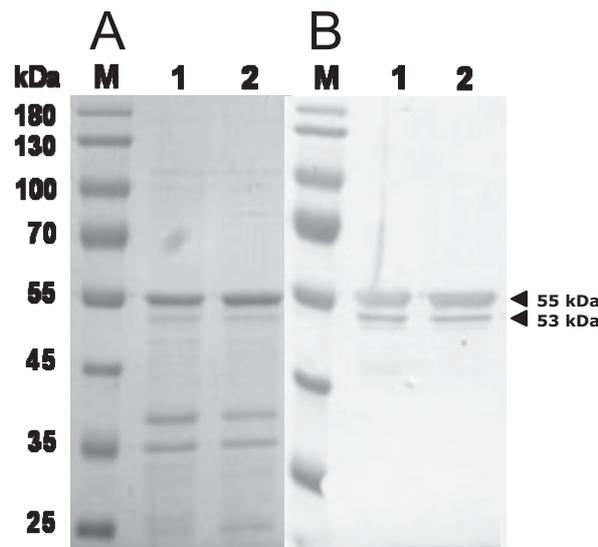


Abbildung 37: Vergleich der Expression und der Membranständigkeit der beiden Formen des Ausgangsprotein bei 29 und 37 °C

Die Zellen wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteinmischung; 1: Ausgangsprotein, Proteinexpression bei 29 °C; 2: Ausgangsprotein, Proteinexpression bei 37 °C.

Die für die durchflusszytometrische Analyse auf Eis gelagerten Bakterien wurden zuerst mit einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und dann mit einem Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert.

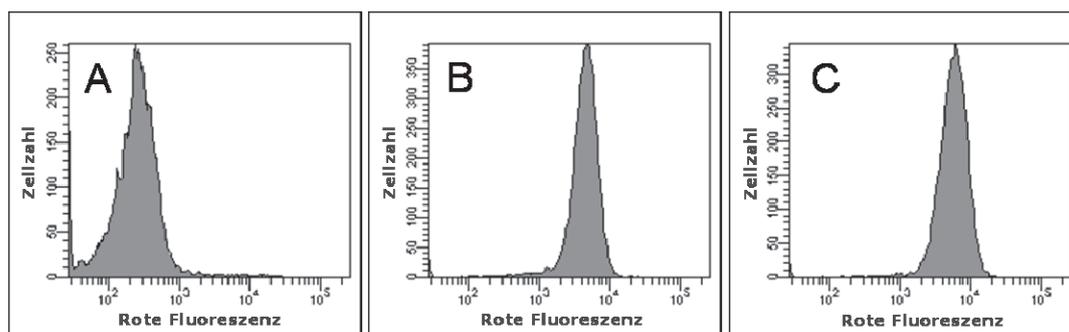


Abbildung 38: Einfluss der Induktionstemperatur auf die Oberflächenständigkeit eines Passagiers des Ausgangsproteins

Die Bakterien wurden angezogen, die Proteinexpression induziert und das auf der Oberfläche präsentierte, lineare Epitop (PEYFK) mit einem Antikörper markiert, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. A: UT5600(DE3) als Negativkontrolle, mF = 422, B: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren, Induktion bei 29 °C, mF = 5103, C: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren, Induktion bei 37 °C, mF = 6106.

Die beiden Proben, deren Proteinexpression bei unterschiedlichen Temperaturen induziert worden war (**Abbildung 38 B, C**), zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle *E. coli* UT5600(DE3), die keine Passagierepitope auf der Oberfläche trugen (**Abbildung 38 A**), eine Erhöhung der mittleren Fluoreszenz. Die mittleren Fluoreszenzen der beiden Proben unterschieden sich dabei kaum. Damit werden offensichtlich gleich viele markierbare Epitope auf der Oberfläche der Bakterienzellen präsentiert. Der Wechsel der Induktionstemperatur von 29 nach 37 ° hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Oberflächenständigkeit eines Passagiers.

7.4.4 Einfluss der Induktionszeit auf die Expression und Integration der beiden Formen des Ausgangsproteins

Nachdem der Einfluss der Induktionstemperatur als vernachlässigbar gering bestimmt worden war, wurde als nächste Variable die Induktionszeit verändert. Standardmäßig erfolgte die Proteinexpression mit 1mM Isopropylthiogalactosid über eine Stunde. Diese Zeitspanne liegt dem Protokoll der Firma Novagen zugrunde, das für den im pET-11d System vorhandenen *T7lac* Promotor entwickelt wurde (Novagen, 2003). Viele der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren basieren auf diesem System.

Eine Hauptkultur (320 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 3,2 ml einer Übernachtskultur von UT5600(DE3)pET-SH3 beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 angezogen. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM Isopropylthiogalactosid bei 37°C und 200 rpm induziert. Es wurden 40 ml sofort ($t=0$ min) und dann im Abstand von 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten weitere Aliquots entnommen und auf Eis gelagert. 1 ml von jedem Aliquot wurde auf eine OD von 0,6 eingestellt und für eine durchflusszytometrische Analyse der Bakterien auf Eis gestellt. Die Außenmembranen wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert, mit Hilfe der SDS-PAGE (10% Acrylamid) getrennt und die Proteine eines Gels auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und danach mit einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers geschüttelt. Nach Zugabe einer Substratlösung entstand an den Stellen, an denen der Antikörper gebunden hatte, ein rotvioletter Farbstoff.

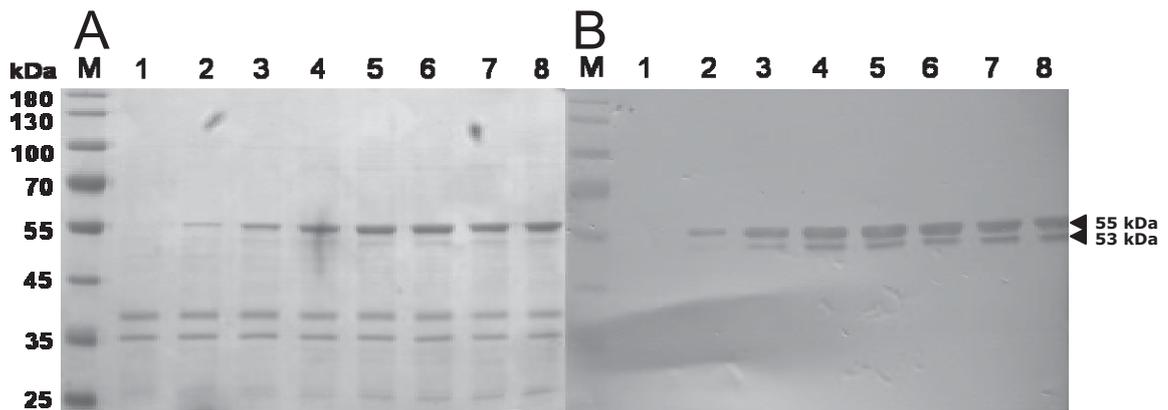


Abbildung 39: Einfluss der Induktionszeit auf Expression und Membranständigkeit der beiden Formen des Ausgangsproteins

Die Zellen wurden angezogen und die Proteinexpression bei einer $OD=0,5$ induziert. Es wurden Proben nach 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten entnommen. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier im Ausgangsprotein vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch; 1: 0 min induziert, 2: 5 min induziert, 3: 10 min induziert, 4: 20 min induziert, 5: 30 min induziert, 6: 40 min induziert, 7: 50 min induziert, 8: 60 min induziert.

In **Abbildung 39** waren sowohl im SDS-Gel (**Abbildung 39 A**) wie auch im Western Blot (**Abbildung 39 B**) bereits nach fünf Minuten (**Abbildung 39** Spur 2) sowohl die prozessierte, funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa, wie auch die unprozessierte, nicht funktionelle Variante des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa sichtbar. Die Menge beider Banden nahm zu, bis nach zwanzig Minuten (**Abbildung 39** Spur 4) keine weitere Steigerung der Bandenstärke beobachtet werden konnte. Um die Proteinexpression maximal zu gestalten, war eine Induktionszeit von zwanzig Minuten ausreichend. Das Autodisplay des Ausgangsproteins konnte durch Verkürzung der Induktionszeit nicht so beeinflusst werden, dass nur die prozessierte, funktionelle Variante gebildet wurde.

Die zur Analyse im Durchflusszytometer bestimmten Bakterien (1 ml mit einer OD von 0,6) wurden mit einem Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörper und einem Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers (gekoppelt mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff) versetzt und ihre mittlere Fluoreszenz ermittelt.

Man erkennt in, dass bereits nach 20 Minuten (**Abbildung 40 E**) eine annähernd maximale mittlere Fluoreszenz erreicht war. Die Fluoreszenz korreliert mit der pro Zelle ge-

bundenen Antikörperzahl und deren Anzahl wiederum mit der Menge der durch Auto-display auf der Oberfläche präsentierten Epitope. Damit war die maximale Anzahl an markierbaren Epitopen auf der Oberfläche gegeben.

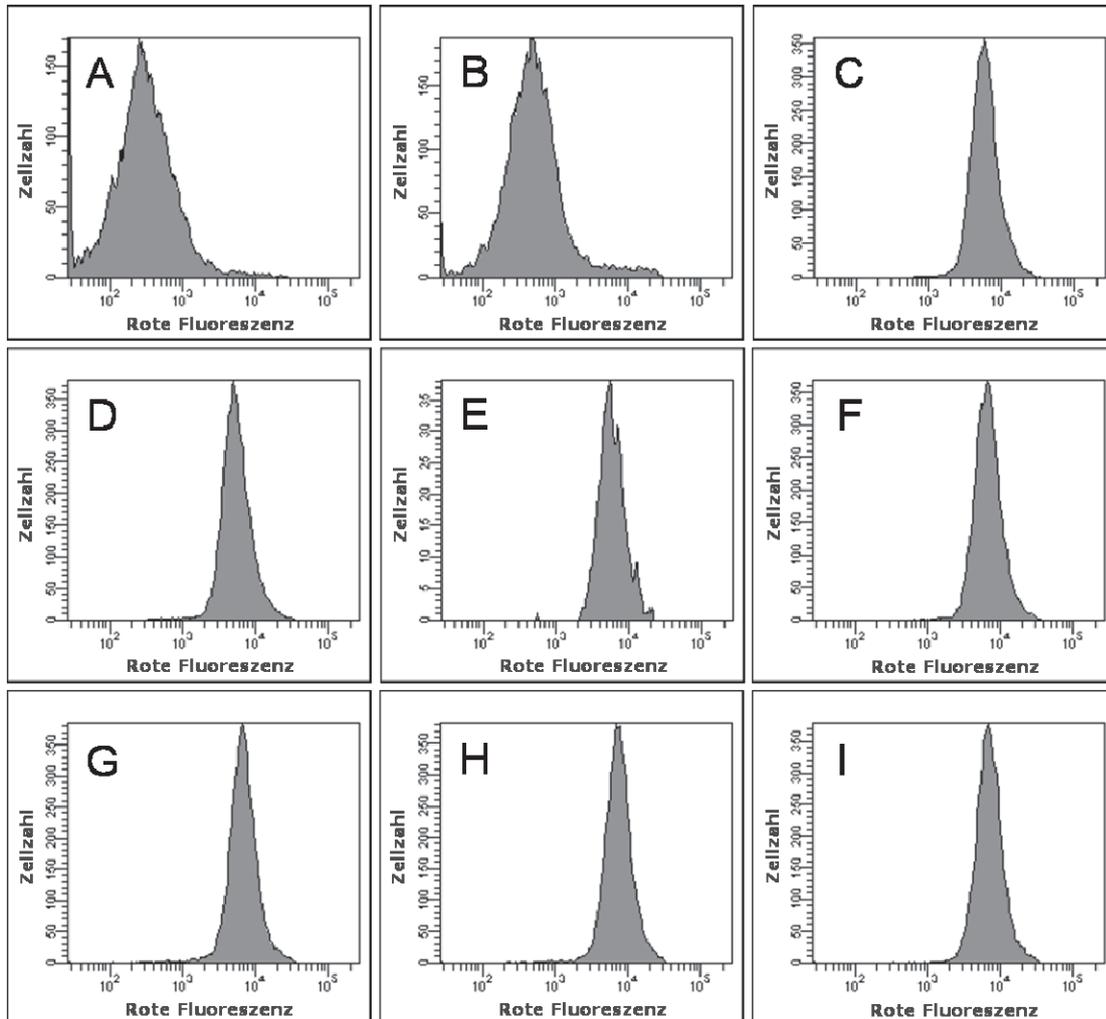


Abbildung 40: Einfluss der Induktionszeit auf die Oberflächenständigkeit eines Passagiers des Ausgangsproteins

Die Bakterien wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten induziert. Das auf der Oberfläche präsentierte, lineare Passagierepitop (PEYFK) des Ausgangsproteins wurde mit einem Antikörper markiert, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. A: UT5600(DE3) als Negativkontrolle, mF = 396; B: 0 Minuten induziert, mF = 550, C: 5 Minuten induziert, mF = 6752, D: 10 Minuten induziert, mF = 6926, E: 20 Minuten induziert, mF = 7504, F: 30 Minuten induziert, mF = 7716, G: 40 Minuten induziert, mF = 8074, H: 50 Minuten induziert, mF = 8040, I: 60 Minuten induziert, mF = 8102.

Eine längere Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG führte nicht zu einer Steigerung der Fluoreszenz, die Zahl an markierbaren Passagierepitopen blieb also

gleich. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem in **Abbildung 39** gezeigten Ergebnis, wo nach 20 Minuten visuell keine Zunahme der beiden Proteinformen des Ausgangsproteins in den Außenmembranproteinisolaten detektierbar war.

7.4.5 Einfluss der IPTG-Konzentration auf die Expression und Integration der beiden Formen des Ausgangsproteins

Als dritte Möglichkeit, die Proteinexpression und damit auch die Entstehung der beiden unterschiedlichen Formen des Ausgangsproteins zu beeinflussen, stand die Änderung der Konzentration des Induktors zur Verfügung. Das untersuchte Vektorsystem beruht auf dem Konstrukt pET-11d der Firma Novagen, in welchem die Transkription unter der Kontrolle des *T7lac* Promotors steht (Studier und Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990; Novagen, 2003). Das Protokoll zur Induktion bezieht sich auf die vom Hersteller gemachten Angaben und sieht eine Induktion über eine Stunde mit 1 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) vor. Durch Änderung der Konzentration könnte es möglich sein, das System zu optimieren und die Bildung von funktionellem Protein zu fördern.

Eine Hauptkultur (520 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 5,2 ml einer Übernachtskultur von UT5600(DE3)pETSH3 beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 inkubiert. Die Probe wurde in dreizehn Aliquots aufgeteilt, in denen die Proteinexpression mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 mM, 0.0001 mM, 0.001 mM, 0.002 mM, 0.004 mM, 0.006 mM, 0.008 mM, 0.010 mM, 0.02 mM, 0.04 mM, 0.06 mM, 0.08 mM, 0.10 mM) an Isopropylthiogalactosid (IPTG) bei 37 °C und 200 rpm eine Stunde induziert wurde. 1 ml von jedem Aliquot wurde auf eine OD von 0,6 eingestellt und für eine spätere, durchflusszytometrische Analyse der Bakterien auf Eis gestellt. Die Außenmembranproteine wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert, durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde in einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und danach in einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers inkubiert. Die Proteine, an die der Antikörper gebunden hatte wurden durch Zusatz einer Substratlösung gefärbt.

In **Abbildung 41** konnte in allen Spuren (1-13) die prozessierte, funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa detektiert werden. Auch ohne Zugabe des Induktors IPTG (**Abbildung 41** Spur 1) wurde eine geringe

Menge des Proteins gebildet. Die Proteinexpression konnte nicht komplett abgeschaltet werden, das System war „leaky“. Die Stärke der Proteinbande nahm mit steigender Induktorkonzentration zu und erreichte ein Maximum bei einer Konzentration von 0,006 mM (Abbildung 41 Spur 6).

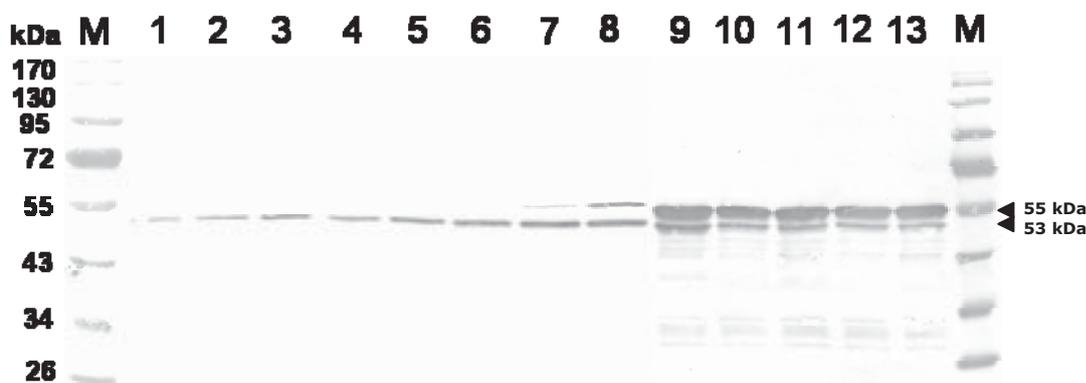


Abbildung 41: Einfluss der IPTG-Konzentration (0,0001-0,1 mM) auf Expression und Membranständigkeit der beiden Formen des Ausgangsproteins

Die Zellen wurden angezogen und die Proteinexpression mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (0,0001-0,1 mM) induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier des Ausgangsproteins in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch; 1: ohne IPTG; 2: 0,0001 mM IPTG; 3: 0,001 mM IPTG; 4: 0,002 mM IPTG; 5: 0,004 mM IPTG; 6: 0,006 mM IPTG; 7: 0,008 mM IPTG; 8: 0,01 mM IPTG; 9: 0,02 mM IPTG; 10: 0,04 mM IPTG; 11: 0,06 mM IPTG; 12: 0,08 mM IPTG; 13: 0,1 mM IPTG.

Wurde die IPTG-Konzentration weiter erhöht, so erschien auch die zweite, unprozessierte, nicht funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa ab einer Induktorkonzentration von 0,008 mM (Abbildung 41 Spur 7). Die Stärke dieser Bande nahm bis zu einer IPTG-Konzentration von 0,02 mM (Abbildung 41 Spur 9) zu, eine weitere Erhöhung der Induktorkonzentration brachte keine Steigerung der Bandenintensität. Es wurde beobachtet, dass mit dem Erscheinen der nicht funktionellen, unprozessierten Form des Ausgangsproteins weitere Banden im Western Blot auftauchten (Abbildung 41 Spur 9-13). Das errechnete Molekulargewicht des Ausgangsproteins betrug 50 kDa. Alle zusätzlich erschienen Banden hatten ein apparentes Molekulargewicht unter 53 kDa, so dass davon ausgegangen wurde, dass es sich um Degradationsprodukte des Ausgangsproteins handeln könnte. Die Abbauprodukte ließen sich mit dem Maus-Anti-PEYFK-Antikörper markieren. Das Passagier-

epitop (PEYFK), das sich am N-Terminus des Proteins befindet, war also noch vorhanden. Da korrekt in die Außenmembran integrierte Proteine gegen proteolytischen Abbau geschützt sind (Schweizer *et al.*, 1978), handelte es sich möglicherweise um Degradationsprodukte der nicht korrekt integrierten Form des Ausgangsproteins mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, die enzymatisch abgebaut worden waren.

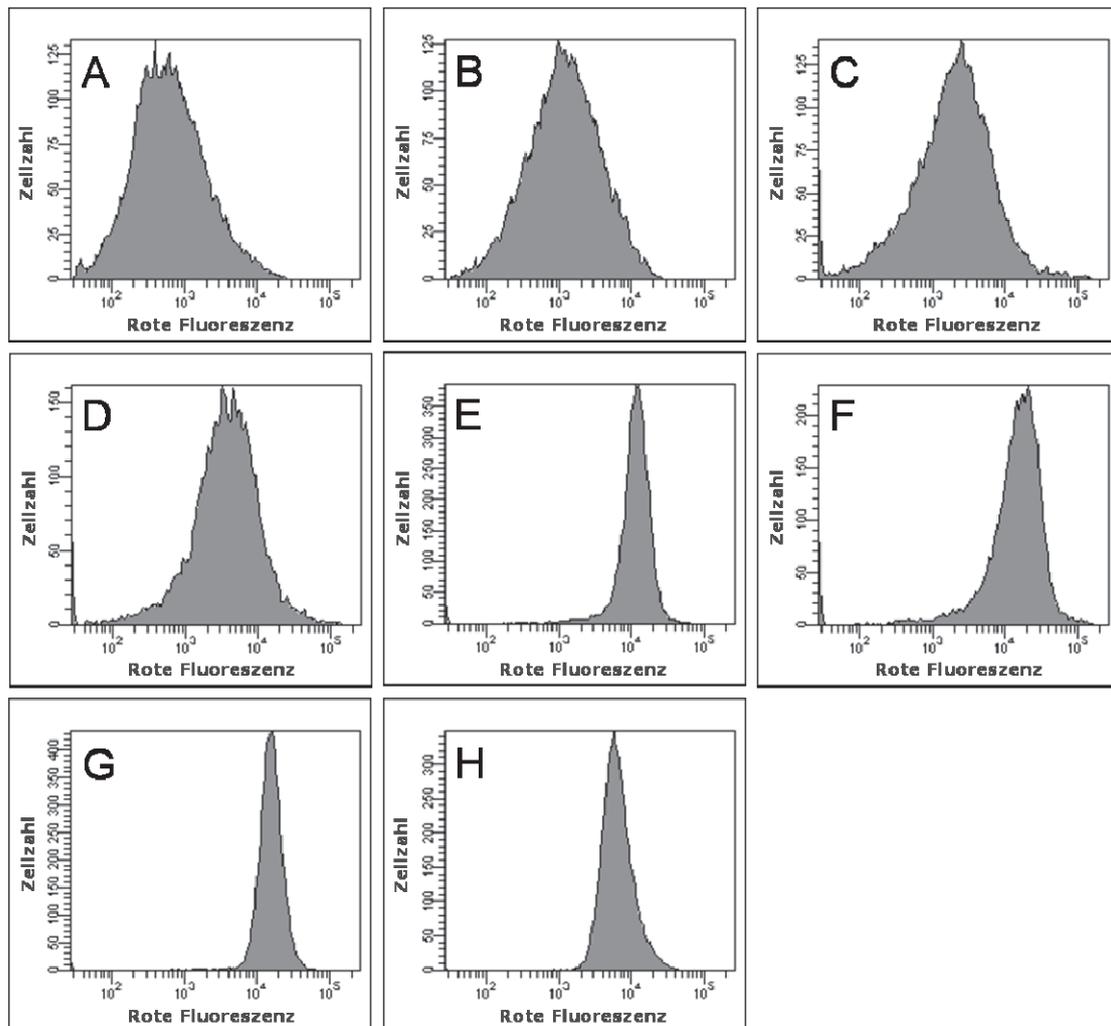


Abbildung 42: Einfluss der IPTG-Konzentration (0,0001-0,1 mM) auf die Oberflächenständigkeit eines Passagiers des Ausgangsproteins

Die Bakterien wurden angezogen und die Proteinexpression mit unterschiedlichen (0,0001-0,01 mM) IPTG-Konzentrationen induziert. Das auf der Oberfläche präsentierte, lineare Passagierepitop (PEYFK) des Ausgangsproteins wurde mit einem Antikörper markiert, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. A: 0 mM IPTG, mF = 1392; B: 0,0001 mM IPTG, mF = 2546; C: 0,001 mM IPTG, mF = 3311; D: 0,002 mM IPTG, mF = 5645; E: 0,004 mM IPTG, mF = 14934; F: 0,006 mM IPTG, mF = 12351; G: 0,008 mM IPTG, mF = 15461; H: 0,010 mM IPTG, mF = 14784.

Die zur Analyse im Durchflusszytometer auf Eis gestellten Zellen (1 ml mit einer optischen Dichte von 0,6) wurden mit einem Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörper und einem Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper (gekoppelt mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff) inkubiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Mit steigender Konzentration an IPTG zeigte sich auch ein Anstieg der mittleren Fluoreszenz bis zu einer Induktorkonzentration von 0,004 (**Abbildung 42 A-E**). Eine weitere Erhöhung der IPTG-Konzentration führte nicht zu einem weiteren Anstieg der Fluoreszenz (**Abbildung 42 E-H**). Wurden mehrere Messungen gemittelt, so reichte eine IPTG-Konzentration von 0,006 um eine maximale mittlere Fluoreszenz und damit auch die größtmögliche Zahl an oberflächenständigen und markierbaren Epitopen zu erreichen. Da die Außenmembranproteine der oben markierten Zellen im Western Blot in **Abbildung 41** analysiert worden waren, konnte die maximale Zahl an oberflächenständigen und markierbaren Epitopen (**Abbildung 42 E**) mit dem Vorhandensein der prozessierten, funktionellen Form des Ausgangsproteins (**Abbildung 41** Spur 5) korreliert werden. Das Auftauchen der unprozessierten und nicht funktionellen Form des Ausgangsproteins (**Abbildung 41** Spuren 7, 8) führte nicht zu einer Erhöhung der Anzahl an oberflächenständigen und markierbaren Epitope (**Abbildung 42 G, H**). Diese Form des Ausgangsproteins präsentiert ihre Epitope also wie erwartet nicht auf der Oberfläche der Bakterien.

Durch die Charakterisierung der beiden Formen des Ausgangsproteins in Kapitel 7.3 konnte gezeigt werden, dass die Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa nicht durch die Signalpeptidase prozessiert worden war. Sie verhielt sich nicht wie funktionell in die Außenmembran integriertes Protein und präsentierte das Passagierepitop nicht auf der Oberfläche der Bakterien. Damit wurde nachgewiesen, dass diese Form des Ausgangsproteins beim Autodisplay keine Rolle spielt. Das Autodisplay konnte so optimiert werden, dass nur prozessiertes und funktionelles Ausgangsprotein gebildet wird. Die optimale Konzentration an IPTG betrug für *E. coli* UT5600(DE3) 0,006 mM und war damit um den Faktor 200 kleiner als die im Standardprotokoll verwendete Konzentration. Dieser Wert sollte als Richtwert gelten, um in Zukunft für jedes neu erstellte Konstrukt, dessen Proteinexpression unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht, eine optimale Induktorkonzentration zu ermitteln.

7.4.6 Koexpression mehrerer Chaperone und Katalysatoren der Faltung und ihr Einfluss auf das Autodisplay

Aus dem Arbeitskreis von Prof. Arne Skerra (Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München) wurde ein Plasmid zur Verfügung gestellt, mit dem es möglich ist, vier verschiedene Chaperone (DsbA, DsbC, SurA und FkpA) in *E. coli* überzuexprimieren (Schlupschy *et al.*, 2006). Der Vektor trägt den p15a Origin of Replication (p15a ori) und ist damit geeignet neben einer großen Anzahl von herkömmlich verwendeten Expressionsplasmiden wie pET-11d, die den ColE1 ori tragen, koexprimiert zu werden. Die Transkription steht unter der Kontrolle zweier konstitutiver Promotoren, P_{dsbA} und P_{fkpA} . Die überexprimierten Proteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe, der Gruppe der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen, gehören DsbA und DsbC (Bardwell, 1994; Missiakas *et al.*, 1994; Shevchik *et al.*, 1994). Sie knüpfen neue Disulfidbindungen in einer Polypeptidkette über die paarweise Oxidation von Cysteinresten und überführen nicht native Konformationen von Thiolen in ihre richtige Stellung. Zur zweiten Gruppe der Chaperone und Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen) gehören SurA und FkpA (Fanghanel und Fischer, 2004). Diese Proteine können nicht nur die Bildung unlöslicher Aggregate im Periplasma verhindern und die Faltung instabiler Proteine initiieren, sondern auch die in neu translatierten Peptiden favorisierte trans-Konfiguration einer Prolin-Peptidbindung in die native cis-Konfiguration überführen. Das Ausgangsprotein als Modellsystem für eine Optimierung des Autodisplay enthält keine Cysteine, so dass DsbA und DsbC keine Rolle spielen sollten. Es sind jedoch im C-terminalen Teil der Linkerregion einige Proline enthalten (Position 33, 34, 36, 41, 59). SurA und FkpA könnten in ihrer Funktion als PPIase und Chaperon Einfluss auf die Zustände des Proteins im Periplasma nehmen.

Die Plasmide pET-SH3, das für das Ausgangsprotein kodiert, und pTUM4 wurden in elektrokompente *E. coli* UT5600(DE3) eingebracht. Es wuchsen viele Klone, von denen vier auf Selektionsplatten (50 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol) ausgestrichen und mittels Restriktionsendonukleaseverdaus überprüft wurden. Es war ein Bakterienstamm entstanden, der zwei Plasmide enthielt: *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3 + pTUM4.

Eine Hauptkultur (80 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol, 10 mM Mercaptoethanol) wurde mit 800 µl einer Übernachtskultur von *E. coli*

UT5600(DE3)pET-SH3 + pTUM4 inokuliert und bis zu einer optischen Dichte(OD) von 0,5 angezogen. Die Probe wurde geteilt, eine Hälfte blieb unbehandelt (Negativkontrolle), in der anderen Hälfte wurde die Proteinexpression induziert. 1 ml jeder Probe wurde auf eine OD von 0,6 eingestellt und für eine spätere, durchflusszytometrische Analyse auf Eis gestellt. Die Außenmembranproteine wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) isoliert, mit Hilfe einer SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörper und Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers inkubiert. Die markierten Proteine wurden durch Zugabe einer Substratlösung sichtbar gemacht. Als Vergleich dienten genauso behandelte *E. coli* UT5600(DE3)pET-SH3.

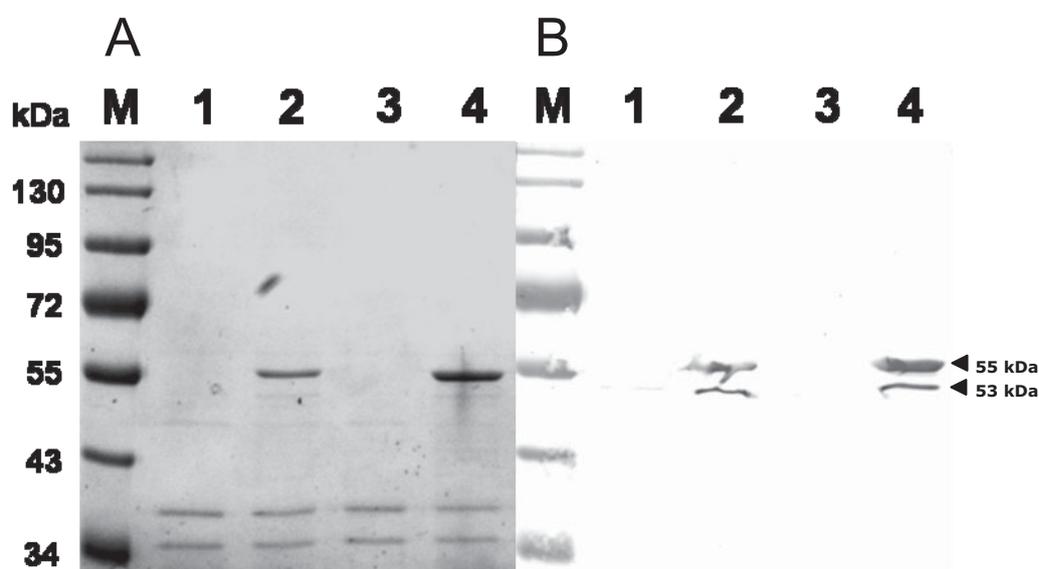


Abbildung 43: Einfluss koexprimierter Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen und PPIasen auf die Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins

Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier des Ausgangsproteins in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch 1: Ausgangsprotein, ohne IPTG, 2: Ausgangsprotein, mit 1 mM IPTG, 3: Ausgangsprotein, Koexpression von DsbA, DsbC, SurA und FkpA, ohne IPTG, 4: Ausgangsprotein, Koexpression von DsbA, DsbC, SurA und FkpA, mit 1 mM IPTG.

In den Spuren 1 und 3 der SDS-PAGE (Abbildung 43 A) und des Western Blots (Abbildung 43 B), in denen die Außenmembranproteine der Stämme aufgetrennt worden waren, deren Proteinexpression nicht induziert worden war, zeigte sich keine Pro-

teinbande mit dem apparenten Molekulargewicht des Ausgangsproteins von 53 kDa. In den Spuren 2 und 4 der SDS-PAGE (**Abbildung 43 A**) und des Western Blots (**Abbildung 43 B**), in denen die Außenmembranproteine der Stämme aufgetrennt worden waren, deren Expression des Ausgangsproteins induziert worden war, konnte sowohl die prozessierte, funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa, wie auch die unprozessierte, nicht funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa detektiert werden. Wurden die Chaperone DsbA, DsbC, SurA und FkpA koexprimiert (**Abbildung 43 Spur 4**), war die Menge beider Proteinformen des Ausgangsproteins im Vergleich zu den Zellen, die die Chaperone nicht koexprimierten (**Abbildung 43 Spur 2**), leicht erhöht.

Es konnte im vorangegangenen Kapitel nachgewiesen werden, dass durch eine Herabsetzung der Induktorkonzentration auf 0,006 mM die Proteinexpression soweit beeinflusst werden konnte, dass nur noch die prozessierte, funktionelle Form des Ausgangsproteins gebildet wurde. Die mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmte Zahl an oberflächenständigen und markierbaren Passagierepitopen verändert sich dabei nicht. Eine Koexpression der vier Chaperone könnte eine Verschiebung zu mehr funktionellem Protein bewirken und die Bildung des nicht funktionellen Proteinzustandes verlangsamen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde die Proteinexpression im Stamm UT5600(DE3)pET-SH3 + pTUM4 mit unterschiedlichen Konzentrationen an Isopropylthiogalactosid induziert und die Proteinmenge und –ausprägung untersucht.

E. coli UT5600(DE3)pET-SH3 + pTUM4 wurden wie oben beschrieben angezogen und die Proteinexpression mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 mM, 0.0001 mM, 0.001 mM, 0.002 mM, 0.004 mM, 0.006 mM, 0.008 mM, 0.01 mM, 0.02 mM, 0.04 mM, 0.06 mM, 0.08 mM, 0.1 mM und 1 mM) an IPTG induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und aufgetrennt.

In **Abbildung 44** konnte in allen Spuren (1-14) die prozessierte, funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa detektiert werden. Auch ohne Zugabe des Induktors IPTG (**Abbildung 44 Spur 1**) wurde eine geringe Menge des Proteins gebildet. Die Proteinexpression konnte nicht komplett abgeschaltet werden, das System war „leaky“.

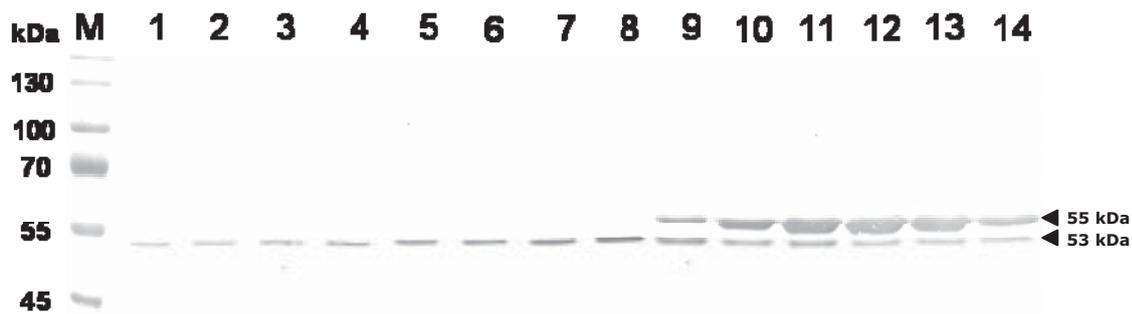


Abbildung 44: Einfluss der IPTG-Konzentration auf Expression und Membranständigkeit der beiden Formen des Ausgangsproteins bei gleichzeitiger Koexpression mehrerer Chaperone

Die Zellen, die die Chaperone DsbA, DsbC, SurA und FkpA konstitutiv exprimieren, wurden angezogen und die Expression des Ausgangsproteins mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (0-1 mM) induziert. Die Außenmembranproteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (A), die Proteine eines anderen Gels wurden auf eine Membran transferiert und das als Passagier des Ausgangsproteins in allen Konstrukten vorhandene Epitop (PEYFK) mit Antikörpern markiert (B). Nach Zugabe einer Substratlösung (Nitroblautetrazoliumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) der Alkalischen Phosphatase färbten sich die Proteinbanden, die das Epitop enthielten. M: vorgefärbtes Referenzproteingemisch; 1: ohne IPTG; 2: 0,0001 mM IPTG; 3: 0,001 mM IPTG; 4: 0,002 mM IPTG; 5: 0,004 mM IPTG; 6: 0,006 mM IPTG; 7: 0,008 mM IPTG; 8: 0,01 mM IPTG; 9: 0,02 mM IPTG; 10: 0,04 mM IPTG; 11: 0,06 mM IPTG; 12: 0,08 mM IPTG; 13: 0,1 mM IPTG; 14: 1 mM IPTG.

Die Stärke der Proteinbande nahm mit steigender Induktorkonzentration zu und erreichte ein Maximum bei einer Konzentration von 0,008 mM (**Abbildung 44** Spur 7). Wurde die IPTG-Konzentration weiter erhöht, so erschien auch die zweite, unprozessierte, nicht funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa ab einer Induktorkonzentration von 0,02 mM (**Abbildung 44** Spur 9). Im Vergleich zur Expression des Ausgangsproteins ohne koexprimierte Chaperone (**Abbildung 41**) konnte die Induktorkonzentration um das Doppelte erhöht werden, ohne dass die unprozessierte, nicht funktionelle Form des Ausgangsproteins gebildet wurde. Die Koexpression der Chaperone verzögerte die Bildung der nicht funktionellen Form des Ausgangsproteins. Die Ursache der Verzögerung könnte in der durch Koexpression der zwei Plasmide verlangsamten Proteinbildung liegen. Die Stärke dieser Bande nahm zu bis zu einer IPTG-Konzentration von 0,06 mM (**Abbildung 44** Spur 11), eine weitere Erhöhung der Induktorkonzentration brachte keine Steigerung der Bandenintensität. Es konnten im Gegensatz zu **Abbildung 41** keine weiteren Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von weniger als 53 kDa beobachtet werden. Das bedeutet nicht, dass diese Banden nicht auch vorhanden sind. Eventuell könnte die

Färbezeit zu kurz gewesen sein, um Proteinbanden mit einer geringen Intensität sichtbar zu machen.

Die zur Analyse im Durchflusszytometer auf Eis gestellten Zellen (1 ml mit einer optischen Dichte von 0,6) wurden zuerst mit einer Lösung eines Maus-Anti-PEYFK-Primärantikörpers und dann mit einer Lösung eines Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörpers (gekoppelt mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff) inkubiert und mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert.

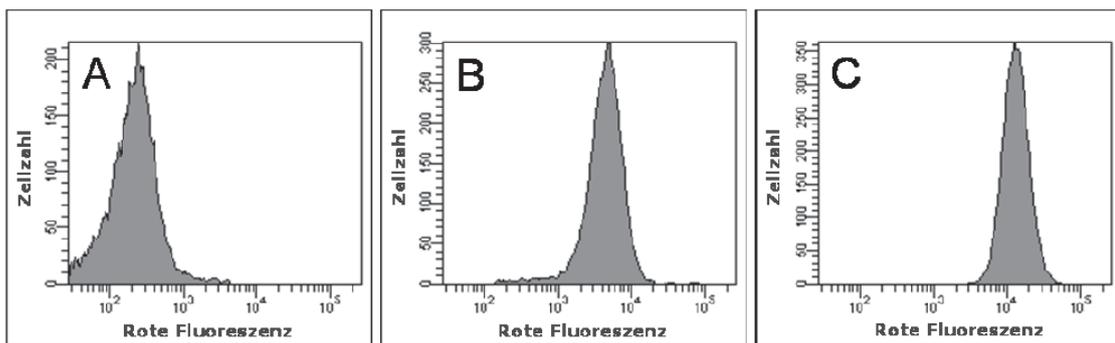


Abbildung 45: Einfluss koexprimierter Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen und PPIasen auf die Oberflächenständigkeit eines Epitops als Passagier des Ausgangsproteins

Die Bakterien wurden angezogen und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Das auf der Oberfläche präsentierte, lineare Passagierepitop (PEYFK) des Ausgangsproteins wurde mit einem Antikörper markiert, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die mittlere Fluoreszenz (mF) der so markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. A: UT5600(DE3) als Negativkontrolle, mF = 228; B: Zellen, die das Ausgangsprotein exprimieren, mF = 5100; C: Zellen, die das Ausgangsprotein und die vier Chaperone DsbA, DsbC, SurA und FkpA exprimieren, mF = 14100.

In **Abbildung 45** zeigten die Zellen, die das Passagierepitop auf der Oberfläche präsentieren können (**Abbildung 45 B**), eine Erhöhung der mittleren Fluoreszenz um den Faktor 20 im Vergleich zur Negativkontrolle, die kein Expressionsplasmid trug (**Abbildung 45 A**). Die Koexpression der vier Chaperone DsbA, DsbC, SurA und FkpA steigerte die mittlere Fluoreszenz noch einmal um das dreifache gegenüber den Zellen, die nur das Ausgangsprotein exprimierten. Wurden mehrere Messungen gemittelt, führte eine Koexpression zu einer Verdopplung der Fluoreszenz im Vergleich zu den Bakterien ohne pTUM4. Durch die Koexpression wurde also die Zahl der oberflächenständigen und markierbaren Epitope auf den Zellen bei einer Induktion mit 1 mM IPTG verdoppelt und das Autodisplay optimiert.

8 Diskussion

8.1 Evolution im Labor

Durch die DNA-Sequenzanalyse ist es möglich, die Basenabfolge eines DNA-Stranges zu bestimmen und auf die Proteinsequenz rück zu schließen. Es stellte sich heraus, dass die Autotransporterproteine, die beim Autodisplay verschiedenster Passagiermoleküle Anwendung fanden, im Laufe der Zeit ihre Proteinsequenz verändert hatten. Legte man die Sequenzen der Transportdomänen zugrunde, wie sie in der SwissProt Datenbank annotiert wurden (Signalpeptid von CtxB aus *V. cholerae*, Accession Nr. P01556; Linker- und β -Fassdomäne von AIDA-I aus *E. coli*, Accession Nr. Q03155), zeigten sich mehrere Aminosäureaustausche in unterschiedlichen Regionen der Transportdomänen. Dabei fanden sich nicht nur Abweichungen zwischen den annotierten Sequenzen und den Transportdomänen des Autodisplay-Systems, sondern auch Abweichungen zwischen den verschiedenen Autotransporter-Konstrukten, die über die Zeit entstanden waren. Sieht man sich ein Konstrukt an, welches durch das Plasmid pJM007 kodiert wird und als erster artifizieller Autotransporter aus CtxB und AIDA-I konstruiert wurde (Maurer *et al.*, 1997), so konnten vier Aminosäureaustausche detektiert werden: A255T im Linker und K1008R, I1013R und R1210E im β -Fass. Eines der nächsten Konstrukte, die entstanden, war die konstitutive Variante des Ausgangsproteins, die durch das Plasmid pJM1013 kodiert wird. Sie unterscheidet sich vom ersten Konstrukt durch eine veränderte Passagierdomäne (Epitop PEYFK) und durch das Auftreten einer weiteren mutierten Aminosäure in den Transportdomänen: G21E. Dieses Konstrukt stellte wiederum das Template zur Konstruktion des in dieser Arbeit untersuchten Ausgangsproteins dar. Das Ausgangsprotein trug im Vergleich zu seiner konstitutiv exprimierten Variante zwei neue Mutationen in seiner Sequenz: I2V, die durch die Klonierungsstrategie bedingt war, und R1212S. Im Laufe der Zeit veränderte sich die Sequenz der Transportdomänen immer weiter, möglicherweise hin zu einem Protein, das optimierte Eigenschaften für die an die Bakterien gestellten Anforderungen aufweist. Als besonders gute Eigenschaften gelten, abhängig von der Anwendung, beispielsweise die Expression großer Mengen von Autotransporterprotein, möglichst viele oberflächenständige und

funktionelle Passagiermoleküle, usw. Sollte sich tatsächlich im kleinen Rahmen ein Kreislauf aus Mutation und Selektion auf eine bestimmte Eigenschaft gebildet haben, so könnte man von Evolution im Labor sprechen.

Betrachtet man die einzelnen Stellen genauer und vergleicht die getauschten Aminosäuren und ihre Parameter miteinander, so fallen zwei Aminosäuren auf, die ihre Eigenschaften stark veränderten. An Position 21 befand sich in der ursprünglichen Sequenz Glycin. Laut Vorhersage durch die Programme SPScan (GCG Wisconsin Package) und SignalP (Nielsen *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1999) wird nach dieser Stelle das Signalpeptid nach Transport über die innere Membran abgespalten. Wurde die Position durch Glutaminsäure ersetzt, wie sie sowohl im konstitutiv wie auch im induziert exprimierten Ausgangsprotein vorlag, so verschob sich, laut SPScan, die Schnittstelle nach Aminosäure 19 (Alanin). Ging man vom Gedanken einer positiven Selektion aus, so könnte die Verschiebung zu einem verbesserten Transport über die innere Membran führen. Es wurde eine Variante konstruiert, die sich nur an Stelle 21 der Aminosäuresequenz vom Ausgangsprotein unterschied (E21G). Die N-terminale Sequenz der prozessierten Proteine wurde bestimmt und es konnte bestätigt werden, dass sich die Signalpeptidaseschnittstelle in der Mutante G21E, wie vorausgesagt, um zwei Aminosäuren nach vorne verschob. Im Vergleich zum Ausgangsprotein, änderte sich weder die Menge an Protein, die außenmembranständig war, noch die Zahl der markierbaren Passagierepitope auf der Oberfläche. Die beiden unterschiedlichen Prozessierungsvarianten beeinflussten die Effizienz des Transportes nicht.

Die zweite Aminosäure, deren Eigenschaften sich durch den Austausch stark veränderten, war Aminosäure 1013. Sie liegt im ersten β -Faltblatt und hatte sich vom neutralen, hydrophoben Isoleucin in ein basisches, polares Arginin gewandelt. Dadurch wurde die Sequenz aus wechselnden hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren im β -Fass an dieser Stelle unterbrochen. Auch hier änderte ein Tausch der Aminosäure zu Arginin weder die Menge an außenmembranständigem Protein noch die Zahl der markierbaren Epitope. Neben der oben beschriebenen Mutationen des Ausgangsproteins war es zu drei weiteren Aminosäureaustauschen im Bereich der β -Fassdomäne im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz von AIDA-I aus *E. coli* gekommen (K1008R, R1210E und R1212S). Wurden alle vier Aminosäuren (K1008R, I1013R, R1210E, R1212S) wieder zur ursprünglichen Sequenz verändert, veränderte sich weder die Menge an in die Au-

ßenmembran integriertem Protein noch die Anzahl der auf der Oberfläche präsentierten Epitope.

Durch die DNA-Sequenzanalyse verschiedener, nacheinander konstruierter Autotransporter-Fusionsgene konnte eine Evolution im Labor über die Zeit gezeigt werden. Alle untersuchten Aminosäureaustausche beeinflussten weder die Menge an in die Außenmembran integriertem Autotransporterprotein, noch die Zahl der an der Oberfläche präsentierten Passagiermoleküle. Die Selektion der ausgewählten Bakterienklone führte zu Varianten, deren Mutationen die Funktionalität des nativen Proteins für die untersuchten Faktoren nicht beeinflussten oder auf die Verbesserung eines nicht untersuchten Faktors abzielten. Es konnte kein evolutiver Wandel zu einem für unsere Zwecke optimierten Transport festgestellt werden.

8.2 Einfluss der carboxyterminalen Aminosäure der Transportdomäne auf die Integration und die Oberflächenständigkeit des Passagiers

Um ein Protein mittels Autodisplay auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen zu präsentieren, müssen verschiedene Prozesse durchlaufen werden (Pohlner *et al.*, 1987; Maurer *et al.*, 1997; Jose und Meyer, 2007). Das System, das alle dafür benötigten Informationen enthält, ist auf einem Plasmid in einem einzigen Fusionsgen kodiert. Dieses wird in ein Vorläuferprotein übersetzt. Das Vorläuferprotein besteht aus vier Teilen: Signalpeptid, Passagier, Linker und β -Fass. Alle Teile erfüllen dabei ganz spezifische Aufgaben, deren Funktionsweise noch nicht vollständig geklärt wurde. In den 80er Jahren wurden von Freudl und Bosch entdeckt, dass die Außenmembranproteine OmpA und PhoE nicht mehr in die äußere Membran integriert wurden, wenn bestimmte Proteinbereiche deletiert wurden (Freudl *et al.*, 1985; Bosch, 1986; Freudl, 1987). Es war allerdings unklar, welches Merkmal für den Einbau in die äußere Membran essentiell ist. Es wurde vermutet, dass bestimmte konformationelle Voraussetzungen gegeben sein müssen. Wenig später wurden durch Pohlner *et al.* (1987) postuliert, dass der carboxyterminale Teil eines Autotransporterproteins, die „Helferdomäne“ oder β -Fass-Domäne, für den Transport der IgA1 Protease über die äußere Membran von *E. coli* verantwortlich ist. Er bildet eine Pore, durch die der Passagier ausgeschleust wird. Dieses Modell wurde auch für AIDA-I aus *E. coli* und das auf Basis von AIDA-I konstruierte artifizielle Auto-

transporterprotein, das dem Autodisplay zugrunde liegt, angenommen (Jose *et al.*, 1995; Suhr *et al.*, 1996; Maurer *et al.*, 1997). Durch Deletionsmutanten am β -Fass konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass einzelne β -Faltblätter, die auf Basis des Computerprogrammes AMPHI (Jahnig, 1990) vorhergesagt worden waren (Jose *et al.*, 1995), essentiell für die Integration in die Außenmembran sind (Maurer *et al.*, 1999). Mit Hilfe der Röntgenkristallographie wurde die räumliche Anordnung zweier Autoporter, NalP und EspP, als aus gegenläufigen β -Faltblättern bestehenden Fass Struktur bestätigt (Oomen *et al.*, 2004; Barnard *et al.*, 2007). Es konnte noch nicht geklärt werden, wie die Integration in die Membran vonstatten geht. In der ersten Hypothese ging man davon aus, dass die C-terminale, hydrophobe, aromatische Aminosäure Kontakt mit den Phospholipiden der Membran aufnimmt, wonach sich die restlichen Aminosäuren des β -Fasses spontan in die Membran einfalten und eine porenähnliche Struktur bilden (Pohlner *et al.*, 1987; Jose *et al.*, 1995). Dabei interagieren die erste und die letzte Membran durchspannende Region miteinander. Sie knüpfen Wasserstoffbrückenbindungen (Henderson *et al.*, 1998). Die Involvierung von Omp85 in die Integration des β -Fasses und den Transport des Passagiers wird noch diskutiert. Die Arbeitsgruppe um Tommassen vermutet, dass Omp85 Außenmembranproteine von periplasmatischen Chaperonen übernimmt und die Faltung und Insertion vermitteln könnte (Voulhoux und Tommassen, 2004). Für AIDA-I aus *E. coli* konnte jedoch bis jetzt keine Kolokalisierung mit Omp85 nachgewiesen werden (Muller *et al.*, 2005). Veiga *et al.* (2002) postulierten für die IgA1 Protease aus *N. gonorrhoeae* die Bildung einer oligomeren Struktur, die sich aus mindestens sechs β -Fässern zusammensetzt. Die Passagierproteine werden durch die zentrale Pore ausgeschleust. Mit der Aufklärung der dreidimensionalen Anordnung der Linker- und β -Fass-Domäne von NalP und EspP, konnte nachgewiesen werden, dass der Linker das hydrophile Innere des β -Fasses durchzieht. Der Sekretionsmechanismus, wie er von Veiga *et al.* postuliert wurde, war damit für diese beiden Proteine nicht anwendbar.

Einige Arbeitsgruppen haben sich, ausgehend von der Wichtigkeit der letzten transmembranären Domäne, mit der Rolle der C-terminalen Aminosäuren des β -Fasses beschäftigt. Die Arbeitsgruppe um Tommassen untersuchte das trimere Außenmembranprotein PhoE aus *E. coli* (Struyvé *et al.*, 1991; de Cock *et al.*, 1997). Sie stellten fest, dass in vielen gramnegativen Organismen die Positionen 1, 3, 5, 7 und 9 ausgehend

vom C-Terminus mit hydrophoben Aminosäuren besetzt sind. Die am höchsten konservierte Stelle lag dabei an Position 1. Sie war in einem Großteil der Proteine von Phenylalanin besetzt. Es wurden verschiedene Mutanten erzeugt, wobei Phenylalanin sowohl gegen andere aromatische und hydrophobe Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin) als auch gegen nicht aromatische und hydrophobe (Valin) und gegen hydrophile (Serin, Asparagin) ausgetauscht wurde. Schließlich wurde die letzte Aminosäure deletiert, so dass der C-Terminus mit einem Glutamin endete (hydrophil, nicht aromatisch). Die Menge an Protein änderte sich kaum, lediglich bei der Valin- und der Deletions-Mutante konnte eine geringe Abnahme festgestellt werden. Ist das Protein korrekt in die Membran inkorporiert, so kann es durch die Protease Trypsin nicht abgebaut werden. Befand sich am C-Terminus eine hydrophobe Aminosäure, wurde das Protein nicht oder wenig durch die Protease abgebaut. Wurde die carboxyterminale Aminosäure deletiert, war bei Struyvé das Protein für die Protease zugänglich, bei DeCock nicht. Kryoschnitte von ganzen Zellen wurden mit Antikörpern gegen natives und denaturiertes PhoE gefärbt. Der Wildtyp produzierte nur nativ in die Außenmembran integriertes Protein, die Deletions-Mutante zeigte im Periplasma denaturiertes Protein. Eine Akkumulierung im denaturierten Zustand im Periplasma müsste eine Zugänglichkeit für Trypsin nach Zellaufschluss nach sich ziehen, die von DeCock jedoch nicht detektiert werden konnte. Die Faltung der Proteine wurde *in vitro* untersucht und eine Herabsetzung der Faltungseffizienz festgestellt, wenn die letzte Aminosäure fehlte. Die Insertion und die Trimerisierung waren nicht beeinträchtigt. Es lässt sich sagen, dass eine Substitution durch andere hydrophobe Aminosäuren den geringsten negativen Einfluss auf Faltung und Insertion hatte. Ein Einfluss auf die Konformation konnte anhand der gegensätzlichen Ergebnisse des Trypsinverdaus der beiden Studien nicht abschließend geklärt werden. Die Methode zur Isolierung der Außenmembranen scheint in beiden Studien fraglich. Die Zellen wurden lediglich aufgeschlossen und die Fragmente sedimentiert.

Hendrixson *et al.* (1997) untersuchten in der Folge das Oberflächenprotein Hap aus *H. influenzae*. Hap zeigt eine signifikante Homologie zur gut untersuchten IgA1 Protease aus *Neisseria* und *Hämophilus*. Es wurde eine β -Fass Struktur mit 14 Faltblättern vorausgesagt. In der letzten transmembranären Domäne fand sich das schon von der Tommassen Gruppe untersuchte Motiv der alternierenden Reihenfolge von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren, wobei hier im Gegensatz zur vorhergehenden Studie Tryp-

tophan das carboxyterminale Ende besetzt. Durch Deletion der letzten drei Aminosäuren des β -Fasses wurde festgestellt, dass diese essenziell für die Insertion in die Außenmembran sind. Die Unterbrechung der amphiphilen Natur der Konsensussequenz durch Tausch der Aminosäuren an Position -2, -3 und -6 ausgehend vom C-Terminus hatte keinen Effekt auf die Integration und die Sekretion. Die Eliminierung des carboxyterminalen Tryptophans verringert die Menge der in die Außenmembran integrierten Moleküle nicht und stimmte darin mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Struyvé und DeCock überein. Die Faltungseffizienz wurde nicht untersucht.

In der durchgeführten Untersuchung am artifiziellen Ausgangsprotein wurde die carboxyterminale Aminosäure Phenylalanin (aromatisch) durch Tryptophan (aromatisch), Tyrosin (aromatisch), Histidin (aromatisch), Valin (aliphatisch) ersetzt oder deletiert. Allen Aminosäuren konnte nach der Hydrophobizitätsskala von Eisenberg (Eisenberg, 1984) ein Wert zugeordnet werden. Dabei hatten Phenylalanin (1.19), Tryptophan (0.81) und Valin (1.08) hohe Hydrophobizitätswerte, Tyrosin (0.26) zeigte eine verminderte Hydrophobizität und Histidin war nicht mehr hydrophob (-0.40). Wurde die letzte Aminosäure deletiert, war Serin die carboxyterminale Aminosäure. Sie zeigt einen hydrophilen Charakter (-0.18). Die Außenmembranproteine wurden isoliert, die Proteine aufgetrennt und das Passagierepitop des Ausgangsproteins spezifisch im Western Blot markiert. Es konnten für alle Mutanten, außer der Mutante F485*, zwei Proteinbanden nachgewiesen werden. Die Proteine sind also außenmembranständig. Die Menge der oberen Bande mit einem Molekulargewicht von 55 kDa war in allen Proben ähnlich. Die Menge der unteren Bande mit einem Molekulargewicht von 53 kDa unterschied sich. Sie entsprach eher dem Molekulargewicht, das für das Ausgangsprotein berechnet worden war (50 kDa). Das Vorhandensein von unterschiedlichen Proteinmengen bei verschiedenen Mutanten stand nur scheinbar im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorhergehenden Studien, da die Gruppe um Tommassen mit ihrem Protokoll zur Aufreinigung der Außenmembranproteine integriertes Protein nicht von nicht integriertem Protein unterscheiden konnte. Die Mutanten mit aromatischen Aminosäuren zeigten bei visueller Detektion im Western Blot im Mittel eine ähnliche Bandenstärke wie das Ausgangsprotein. Die Variante F485V zeigte eine leicht erniedrigte Menge der Proteinform mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa, bei der F485* Mutante konnte keine Proteinbande mit diesem Molekulargewicht nachgewiesen werden.

Eventuell wurden beide Proteine nicht effizient gefaltet oder inkorporiert und daher durch periplasmatische Proteasen abgebaut (Henderson *et al.*, 1998; Jose und Zangen, 2005). Die Untersuchung der Oberflächenständigkeit durch Markierung eines transportierten Passagierepitops mit einem Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war, ergab, dass verschiedene aromatische Aminosäuren mit unterschiedlicher Hydrophobizität am C-Terminus im Vergleich zur Variante mit einem carboxyterminalen Phenylalanin den Transport und die Insertion in die Außenmembran nicht negativ beeinflussen. War die letzte Aminosäure hydrophob und nicht mehr aromatisch (Valin), halbierte sich die Menge an markierbarem Epitop. DeCock *et al.* (1997) konnten im Kryoschnitt eines Bakteriums, welches die Valin-Mutante von PhoE exprimiert, zu gleichen Teilen integriertes, natives Protein als auch periplasmatisch vorliegendes, denaturiertes Protein nachweisen. Die Mutante F485* zeigte keine markierbaren Epitope auf der Oberfläche. Übereinstimmend konnte DeCock im Kryoschnitt der Deletions-Mutante von PhoE nur periplasmatisch vorliegendes, denaturiertes Protein detektieren. Es konnte für die Mutante F485* nachgewiesen werden, dass die verminderte Menge der Proteinform mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa mit dem Verlust der markierbaren, oberflächenständigen Passagierepitope und damit auch an korrekt integriertem β -Fass korrelierte. Der Passagieranteil der Proteinform mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa wird weder korrekt an der Oberfläche präsentiert, noch in die Außenmembran integriert und zu einem späteren Zeitpunkt näher besprochen. Es wurde damit festgestellt, dass eine aromatische Aminosäure am C-terminalen Ende der β -Fass-Domäne essenziell für einen korrekten Transport des Passagiers ist. Verschiedene aromatische Aminosäuren (F, W, Y, H) konnten ohne Funktionsverlust des Autotransporters gegeneinander ausgetauscht werden. Wurde der C-Terminus durch eine hydrophobe, nicht aromatische Aminosäure wie Valin besetzt, zog das eine verminderte Insertions- und Transporteffizienz nach sich. Die Rolle der aromatischen Aminosäure muss noch weiter untersucht werden. Sie könnte die Kontaktaufnahme mit der Außenmembran (Struyvé *et al.*, 1991) vermitteln.

Nach Robert *et al.* (2006) könnte das Außenmembranprotein Omp85 aus *E. coli* eine hochkonservierte Konsensussequenz am carboxyterminalen Ende benötigen, um ein Außenmembranprotein korrekt zu integrieren. Diese besteht aus den letzten beiden Aminosäuren und erfordert Glutamin oder eine ähnliche Aminosäure an Position 2 und

Phenylalanin an Position 1, ausgehend vom C-Terminus. Eine ähnliche Konsensussequenz (S484F485) wurde auch im untersuchten β -Fass von AIDA-I gefunden. Obwohl keine Kollokalisierung mit Omp85 für AIDA-I nachgewiesen werden konnte (Muller *et al.*, 2005), scheint eine Bindung an weitere Chaperone im Periplasma möglich (Werner, 2005; Sklar, 2007). Für das periplasmatische Chaperon SurA ist beispielsweise bekannt, dass es ein Tyr-X-Phe Motiv erkennt und essenziell für die korrekte Insertion des Außenmembranproteins OmpF ist (Kloser *et al.*, 2001; Bitto und McKay, 2003; Jackups *et al.*, 2006). Diese Konsensussequenz bestand auch im C-Terminus des untersuchten Ausgangsproteins (YSF) und konnte in ähnlicher Weise auch in den Mutanten F485W, F485Y und F485H gefunden werden, in denen Phenylalanin gegen andere aromatische Aminosäuren ausgetauscht wurde. Sie fehlte teilweise in der Mutante F485V und der Mutante F485*, die beide eine verringerte Oberflächenexpression zeigten. Es konnte durch diese Untersuchung nicht eindeutig geklärt werden, ob der konservierte Bereich als Transportsignal dient oder für die Stabilisierung einer bestimmten Konformation durch Chaperone benötigt wird.

Alle Untersuchungen zum Einfluss des C-Terminus des β -Fasses wurden im Bakterienstamm *E. coli* UT5600(DE3) durchgeführt, der als Expressionsstamm Anwendung findet. Weit verbreitet ist der Stamm *E. coli* BL21(DE3) (Terpe, 2006). Beide Stämme sind *ompT* defizient und können so das transportierte Passagiermolekül nicht von der Oberfläche abspalten. Sie sind optimiert auf die Überexpression von Proteinen. Als dritte Alternative wurde der Stamm *E. coli* JK321(DE3) ebenfalls mit den Plasmiden transformiert, die für die Mutanten kodieren. JK321(DE3) ist nicht nur defizient für das Gen *ompT* sondern auch für *dsbA* (Jose *et al.*, 1996). Das Gen *dsbA* kodiert für eine periplasmatische Oxidoreduktase, die die Cysteine eines Proteins miteinander verknüpfen kann, so dass sich dreidimensionale Strukturen ausbilden. Da solche Strukturen wegen ihrer sterischen Ausdehnung meist nicht transportkompatibel sind, wird eine Akkumulation des Autotransporterproteins im Periplasma und eine nachfolgende Degradation verhindert (Jose *et al.*, 2005). Wurden die Mutanten der carboxyterminalen Aminosäure (F485, F485W, F485Y, F485H, F485V, F485*) in den Stämmen *E. coli* BL21(DE3) und JK321(DE3) exprimiert, so ergab sich ein ähnliches Bild wie bei *E. coli* UT5600(DE3). Alle Varianten bildeten zwei Proteinformen mit unterschiedlichem apparenten Molekulargewicht aus (55 und 53 kDa), von denen eine dem errechneten

Molekulargewicht von 50 kDa eher entsprach. Diese unterschieden sich nicht von den beiden Proteinzuständen, die in *E. coli* UT5600(DE3) detektiert worden waren. Alle Mutanten mit aromatischen Aminosäuren zeigten weder weniger Protein in der Außenmembran noch eine verringerte Menge an oberflächenständigem, markierbarem Passagierepitop im Vergleich zum Ausgangsprotein. Die Mutante F485V zeigte im Vergleich zum Ausgangsprotein sowohl eine Verringerung der außenmembranständigen Proteinform mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa, als auch eine Halbierung der oberflächenständigen und markierbaren Passagierepitope. Wurde das carboxyterminale Phenylalanin deletiert, so verschwand diese Proteinform aus den isolierten Außenmembranproteinen. Es konnte keine oberflächenständigen, markierbaren Passagierepitope auf den Zellen detektiert werden. Der Wechsel des Expressionsstammes bringt keinen Vorteil für die Expression des Ausgangsprotein und seiner Mutanten.

8.3 Die beiden Varianten des Ausgangsproteins

Im Zuge der Untersuchungen zur carboxyterminalen Aminosäure der β -Fass-Domäne war aufgefallen, dass nach einer Auftrennung mit Hilfe der SDS-PAGE im erwarteten Molekulargewichtsbereich zwei unterschiedliche, prominente Proteinbanden detektiert werden konnten. Nach einer Methodenoptimierung konnten beide Banden adäquat voneinander getrennt werden. Eine breite Bande zeigte ein apparentes Molekulargewicht von circa 55 kDa. Eine wesentlich schmalere Bande zeigte ein apparentes Molekulargewicht von 53 kDa. Beide reagierten mit dem für das Passagierepitop (PEYFK) spezifischen Antikörper und konnten damit als unterschiedliche Proteinformen des Ausgangsproteins verifiziert werden. Die Banden tauchten in den Außenmembranproteinisolaten aller untersuchten Varianten des Ausgangsproteins mit Ausnahme der F485*-Mutante auf. Aus früheren Untersuchungen der konstitutiven Varianten des Ausgangsproteins durch Maurer *et al.* (1999) und der Untersuchung verschiedener anderer Außenmembranproteine wie OmpA oder PhoE durch andere Arbeitsgruppen (Baneyx und Georgiou, 1990; Baneyx und Georgiou, 1992; de Cock *et al.*, 1996; Sugawara *et al.*, 1996) war bekannt, dass Proteine mit einem β -Fass-Anteil eine Reihe von typischen Reaktionen zeigen. Der in die Membran integrierte Teil der Transportdomänen ist vor dem Verdau mit extrazellulär zugesetzten Proteasen wie Trypsin oder Proteinase K geschützt (Protease resistenter Kern). Durch die sehr stabile β -Faltblattstruktur wird die

Sekundär- und Tertiärstruktur der Domäne nicht allein durch Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat aufgelöst. Sie muss durch die Zufuhr von Hitze denaturiert werden (Heller, 1978). Bei Maurer *et al.* (1997) zeigte das konstitutiv exprimierte Ausgangsprotein genau dieses Verhalten. Die beiden Formen des Ausgangsproteins, die nach Induktion der Proteinexpression gebildet wurden, verhielten sich unter gleichen Bedingungen unterschiedlich. Die obere Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zeigte weder Hitzedenaturierbarkeit, noch ließ sie sich mit Trypsin oder Proteinase K verdauen. Die untere Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa ließ sich bei 70 °C denaturieren. Die Proteinbande verschob sich zu einem größeren apparenten Molekulargewicht. Sie verhielt sich in der SDS-PAGE genauso wie ihre konstitutive Variante. Sowohl mit Trypsin wie auch mit Proteinase K konnten die extrazellulär vorliegenden Teile (Passagier, Linkeranteil) verdaut werden. Zurück blieb der nicht prozessierbare, Protease resistente Kern. Gleiches gilt für die Prozessierung durch die auf manchen Stämmen oberflächenständige Protease OmpT (Rupprecht *et al.*, 1983; Grodberg und Dunn, 1988). Auch hier wird nur die untere Bande bis auf den Protease resistenten Kern umgesetzt. Der prozessierte und damit oberflächenständige Teil mit Passagier und Linkerdomäne wurde in den Überstand entlassen und konnte dort mittels Western Blot nachgewiesen werden. Die Mutante F485V wurde ebenfalls auf ihr Laufverhalten im SDS-Gel nach Denaturierung bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Wie oben beschrieben, zeigte sie eine verringerte Menge an außenmembranständigem Protein und an oberflächenständigem und markierbarem Passagier. Im SDS-Gel verhielt sie sich genauso wie das Ausgangsprotein. Sie zeigte ebenfalls zwei Banden von denen nur die untere den für β -Fässer typischen Hitzeshift bei ca. 70 °C aufwies. Das denaturierbare Protein ist also in derselben Konformation wie das Ausgangsprotein gefaltet. Der Ersatz des C-terminalen Phenylalanins gegen Valin beeinflusst die Stabilität der β -Fass Struktur gegen Hitze nicht. Die Kinetik der Faltungsreaktion wurde noch nicht untersucht. Die verminderte Menge an auf der Oberfläche präsentierendem und markierbarem Passagier könnte auf eine verminderte Effizienz der Insertion hindeuten.

Mit Hilfe der Außenmembranproteinaufreinigung auf Basis der Methode nach Hantke (Hantke, 1981) konnten die beiden Proteinformen des Ausgangsproteins nicht zufrieden stellend voneinander getrennt werden. Wenn es sich um zwei verschiedene Formen des Proteins handelt, musste es möglich sein, diese durch ihr unterschiedliches Verhalten

voneinander abzugrenzen. Während der Proteinisolierung werden die Membranen mit Hilfe des Detergenz Triton X-100 solubilisiert, um die Zellen aufzuschließen. Dabei wird nach Schnaitman (1971a; 1971b) in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen gearbeitet um selektiv die Proteine der inneren Membran in Lösung zu bringen. Das Detergenz N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium solubilisiert nach Filip *et al.* (1973) ebenfalls selektiv die innere, zytoplasmatische Membran. Zur Abtrennung der inneren Membran wurde das Proteinisolat in N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium geschwenkt. Dabei veränderte sich die Zusammensetzung beiden Formen des Ausgangsproteins nicht nachweisbar. OmpA besitzt als Vertreter der in die Außenmembran integrierten Proteine eine β -Fass-Domäne (Garavito und Rosenbusch, 1980; Garavito *et al.*, 1982; Cowan *et al.*, 1995; Sugawara *et al.*, 1996; Koebnik *et al.*, 2000). Es eignet sich daher als Indikatorprotein für das typische Verhalten solcher Strukturen. Nachdem die sedimentierten Außenmembranproteine diesmal vollständig in N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium gelöst worden waren, befand sich die funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa zusammen mit OmpA im Überstand. Die zweite, nicht funktionelle Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa wurde sedimentiert. Das Ergebnis überraschte, da nach Filip die Außenmembranen im Sediment verbleiben sollten, wohingegen die Zytoplasmamembran in Lösung geht. Man erwartete, dass sich alle Außenmembranproteine in der Fraktion befinden, in der sich auch die Außenmembranen aufhalten sollten, also im Sediment. In einer Untersuchung von Baik *et al.* (2004) an der sarcosylunlöslichen Membranfraktion von *Helicobacter pylori* Stamm 26695 konnten 62 verschiedene Außenmembranproteine mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Omp22 und Omp18, zwei Proteine die bei *H. pylori* zur OmpA-Familie gezählt werden (UniProtKB/TrEMBL, Accession Nr. Q1HDT1 und A8D1M5), waren nicht darunter. Es ist also möglich, dass Omp18 und Omp22 sich nicht in der sarcosylunlöslichen Fraktion, sondern im Überstand befanden. Deshalb ist es denkbar, dass auch OmpA und die untere Form des Ausgangsproteins aus *E. coli* im Detergenz N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium löslich sind. In einer Untersuchung von Geertsma (2008) an Fusionsproteinen aus verschiedenen Membranproteinen und GFP (Green Fluorescent Protein) konnte ebenfalls die Bildung einer Doppelbande aus nicht funktioneller oberer Bande und funktioneller unterer Bande nachgewiesen werden. Nach einer

Solubilisierung in mehreren milden Detergenzien zeigte sich, dass korrekt gefaltetes Protein langsamer sedimentierte als seine unlöslichen Aggregate. Nach der Ultrazentrifugation konnte nur die gefaltete Variante im Überstand detektiert werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der in dieser Arbeit durchgeführten Trennung der beiden Banden des Ausgangsproteins durch Solubilisierung in N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium und anschließender Zentrifugation. Wurden alle gewonnenen Erkenntnisse miteinander verglichen, so verhielt sich nur die untere Bande des Ausgangsproteins wie ein funktionell als β -Fass in der Außenmembran verankertes Protein. Das Protein der oberen Bande zeigte sich als nicht korrekt gefaltet und seine Passagierdomäne als nicht oberflächenständig. Für Bakterien, die mittels Autodisplay die Z-Domäne von Protein A auf der Oberfläche präsentieren, konnte nachgewiesen werden, dass es nach Induktion der Proteinexpression ebenfalls zur Ausprägung der beiden unterschiedlichen Proteinformen kam. Die untere Bande, die in geringerer Menge vorlag, repräsentierte das Protein, das seine Passagierdomäne auf der Oberfläche präsentiert. Die Anzahl der mittels Autodisplay auf der Oberfläche präsentierten Z-Domänen und damit auch der funktionellen, außenmembranständigen Proteine konnte mit $2,3 \times 10^5$ ermittelt werden. Sie bestätigt damit die in früheren Experimenten bestimmte Anzahl von $1,5$ bzw. $1,8 \times 10^5$ (Jose *et al.*, 2001; Jose und von Schwichow, 2004a) für das Autodisplay verschiedener Passagierproteine und übersteigt die anderer Oberflächenexpressionssysteme, wie zum Beispiel das Surface Display durch das Autotransporterprotein EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* in *E. coli* mit $8,1 \times 10^3$ Molekülen pro Zelle (Wilhelm *et al.*, 2007).

Durch Analyse der beiden im SDS-Gel detektierbaren Proteinformen mit Hilfe der Gel-Pro-Analyzer Software (MediaCybernetics, Bethesda, USA) zeigte sich, dass die nicht funktionelle Proteinbande ein um 2,4 kDa höheres apparentes Molekulargewicht aufwies. Diese Differenz deckte sich mit dem errechneten Molekulargewicht des Signalpeptides, das durch die Signalpeptidase A prozessiert wird (Dalbey, 1985; Dalbey, 1991). Es beträgt 2,2 kDa (Aminosäure 1-21). Die Sequenzen der N-Termini der beiden Formen des Ausgangsproteins wurden mit Hilfe von Massenspektrometrie und Edman-Abbau bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die Form des Ausgangsproteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa, welche im nicht nativ gefalteten Zustand anfällt, in einer unprozessierten Form vorliegt. Das Signalpeptid wurde nicht abgespalten. Die funktionelle Form des Ausgangsproteins, deren Molekulargewicht von 52,3

kDa um 2,4 kDa geringer ausfällt, trägt das Signalpeptid nicht mehr und ist korrekt in die Außenmembran integriert. Es fiel auf, dass das unprozessierte Protein nach einer Trennung der Zellkompartimente in der Fraktion der Membranproteine anfällt. Es lässt sich durch die Behandlung mit dem Detergenz N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium vom Indikatorprotein OmpA und von der prozessierten, funktionellen Form abtrennen. Damit muss es in einer anderen Form vorliegen und andere Eigenschaften aufweisen. Betrachtet man den Typ-V-Sekretionsweg (Pohlner *et al.*, 1987; Pugsley, 1993; Henderson *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 2004; Jose und Meyer, 2007), so fallen einige Stellen auf, die sich als „Flaschenhals“ der Reaktion herausstellen und zur Bildung nicht nativen Proteins führen könnten. Da das Signalpeptid in einer Form des Ausgangsproteins nicht abgespalten wurde, kann das Protein nicht korrekt an der Außenmembran verankert sein. Die Translation erfolgt an den Ribosomen im Zytoplasma. Danach können mehrere Wege beschrrieben werden, die dazu führen, dass das unprozessierte Vorläuferprotein mit Hilfe seines Signalpeptides in den Sec-Transportweg eingeschleust wird. Die meisten Proteine werden wahrscheinlich an SecB, ein Chaperon, gebunden (Henderson *et al.*, 1998; Brandon *et al.*, 2003) und in einer transportkompetenten Form an die Translokationseinheit des Sec-Mechanismus weiter gereicht (Bieker und Silhavy, 1990; Pugsley, 1993). Diese schleust das Protein durch die innere Membran, wonach das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase abgespalten und das Protein ins Periplasma entlassen wird (Dalbey, 1985; Dalbey, 1991; Pugsley, 1993). Dort kann es bis zur Integration in die Außenmembran an ein Chaperon wie SurA gebunden werden (Lazar und Kolter, 1996). Jeder dieser Schritte ist in seiner Kapazität begrenzt. Wird durch eine Überexpression sehr viel Protein gebildet, so könnte es möglich sein, dass das Protein an verschiedenen Stellen akkumuliert. Bei einer Störung des Transportes über die innere Membran, sei es durch Überlastung von eventuellen Chaperonen, wie SecB, oder der Teile der Translokationseinheit, kann das im Zytoplasma anfallende Protein zu „Inclusion Bodies“ aggregieren und sich damit in einer transport inkompatiblen Form befinden (Kane, 1988; Bowden *et al.*, 1991; Strandberg und Enfors, 1991; Baneyx und Mujacic, 2004). Für verschiedene Proteine, wie OmpA und MBP (Maltose Binding Protein), wurde von Dalbey und Wickner (1985) nachgewiesen, dass sie nach Inaktivierung der Signalpeptidase zwar transportiert, jedoch nicht prozessiert wurden. Das transportierte Protein blieb mit der Membran verhaftet und ragte ins Periplasma. Wird viel Protein

über die innere Membran transportiert, könnte eine Überlastung der Signalpeptidase oder der Chaperone, die das Protein im Periplasma binden, dazu führen, dass ein Teil des transportierten Autotransporterproteins nicht prozessiert wird und an der Membran verbleibt. Dieser Anteil würde keine korrekte Sekundär- und Tertiärstruktur ausbilden und, wie die nicht funktionelle Form des Ausgangsproteins, ein anderes Verhalten zeigen als das gefaltete Protein. Van Dijl konnte 1991 zeigen, dass durch eine Überexpression der Signalpeptidase I in *E. coli* ein Protein in größerer Menge prozessiert wurde als bei normaler Expression der Signalpeptidase. Eine Überexpression der Signalpeptidase I im Autodisplay System könnte für die Zukunft weitere Aufschlüsse über den Aufenthaltsort der unprozessierten, nicht funktionellen Proteinform bringen und das Mengenverhältnis von nicht prozessiertem zu prozessiertem und funktionellem Protein verschieben. Die Rolle der Signalpeptidase I als „Flaschenhals“ der Transportreaktion beim Autodisplay im induzierbaren System könnte weiter beleuchtet werden.

8.4 Optimierung der Bildung der funktionellen Form des Ausgangsproteins

Die Charakterisierung der untersuchten artifiziellen Autotransporterkonstrukte deckte auf, dass ein großer Anteil des überexprimierten Ausgangsproteins in einer unprozessierten, nicht funktionellen Form vorliegt. Diese Artefakte gelangen nicht an ihren Bestimmungsort und bringen keinen Vorteil für das Autodisplay System. Sie können im Gegenteil einen Wachstumsnachteil gegenüber anderen konkurrierenden Mikroorganismen darstellen, da ihre Produktion einen zusätzlichen Stressfaktor bildet. Alle Vektoren, die zwei unterschiedliche Formen des Proteins bilden, lassen sich auf das pET- oder das pCOLA-Duet-1 System zurück führen (Studier und Moffatt, 1986; Novagen, 2003). Da es sich bei beiden um ein System mit induzierbarer Proteinexpression handelt, gab es Möglichkeiten die Proteinbildung zu beeinflussen.

In verschiedenen Studien mit Expressionsvektoren konnte nachgewiesen werden, dass die Temperatur, bei der die Induktion oder das Wachstum stattfinden, einen entscheidenden Einfluss auf das gebildete Protein haben kann (Schein, 1988; Chalmers *et al.*, 1990). Die Proteinexpression des Ausgangsproteins wurde bei zwei Standardtemperaturen (29 °C, 37 °C) untersucht. Es konnte dabei kein Einfluss der Temperatur auf die Ausprägung der beiden Proteinformen beobachtet werden. Als zweite Möglichkeit der

Steuerung des T7lac-Promotors wurde die Induktionszeit sukzessive verkürzt. Es konnte keine Zeitspanne ermittelt werden, bei der nur die prozessierte, funktionelle Proteinform vorlag. Selbst nach nur 5 Minuten Induktionszeit waren beide Proteinformen detektierbar. Durch die Verkürzung der Induktionszeit konnte das System nicht so gesteuert werden, dass sich nur die funktionelle Proteinform bildete. Von Terpe (2006) wurde berichtet, dass die Bildung von nicht funktionellem, unlöslichen Protein durch verschiedene Faktoren bedingt sein kann. Neben der Temperatur wurden die Art des Promotors und die Konzentration an Induktor angeführt. Durch Herabsetzung der Konzentration des Induktors Isopropylthiogalactosid können Expressionssysteme so beeinflusst werden, dass hauptsächlich funktionelles Protein gebildet wird. Das in dieser Arbeit verwendete pET-System, bei dem die Proteinexpression unter der Kontrolle des T7lac-Promotors steht, zeigte eine optimale Präsentation des Passagierepitops des Ausgangsproteins auf der Oberfläche bei einer Konzentration von 6×10^{-3} mM an Induktor. Dabei wurde selektiv nur prozessiertes, funktionelles Protein gebildet, die zweite Form konnte im Western Blot nicht detektiert werden. Der Wert liegt um den Faktor 170 niedriger als die üblicherweise verwendete Konzentration des Induktors. Eine Erhöhung der Konzentration zog immer die Ausbildung der unprozessierten, nicht funktionellen Proteinform nach sich. Die Zahl der markierbaren Epitope auf der Oberfläche der Zellen erhöhte sich dabei nicht. Durch die Reduktion der Induktorkonzentration war es möglich, den Promotor so zu steuern, dass ausschließlich die funktionelle Proteinform auftrat.

Mit dem Plasmid pTUM4 aus der Arbeitsgruppe von Arne Skerra (Lehrstuhl für biologische Chemie, TU München) stand ein Vektor zur Verfügung, mit dem es möglich war, vier periplasmatische Chaperone (DsbA, DsbC, SurA, FkpA) zu überexprimieren. Schlapschy *et al.* (2006) konnten nachweisen, dass die Koexpression der Proteine sich beispielsweise positiv auf die Bildung von Disulfidbindungen in löslichem, rekombinant produzierten „human plasma retinol-binding protein“ auswirkte. DsbA und DsbC, die die Bildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken katalysieren, interessierten bei dieser Untersuchung nicht, da das Ausgangsprotein keine Cysteine enthält. SurA und FkpA gehören zur Gruppe der Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerasen und besitzen Chaperonaktivität (Fanghanel und Fischer, 2004). Neben ihrer Fähigkeit trans konfigurierte Prolinbindungen in ihre native cis Konfiguration zu überführen, konnte von Kolter (1996) und Rouviere (1996) nachgewiesen werden, dass SurA eine Rolle bei der Fal-

tung und Integration der Außenmembranproteine OmpA, OmpF und LamB spielt. Nach Bitto und McKay (2003) wird eine spezifische Sequenz erkannt (aromatisch-x-aromatisch), die in Außenmembranproteinen gehäuft auftritt und auch im untersuchten Ausgangsprotein nachgewiesen werden konnte. Wurden beide Plasmide im Bakterienstamm *E. coli* UT5600(DE3) koexprimiert, so stieg die Menge an Ausgangsprotein in der Außenmembranproteinfraction leicht an. Die Menge an markierbarem Passagier auf der Oberfläche der Zellen verdoppelte sich. Es wurden immer noch beide Proteinformen gebildet. Reduzierte man die Menge an Induktor, bildete sich die nicht funktionelle Proteinform erst bei höheren Konzentrationen (0,02 mM IPTG), im Vergleich zum Stamm, der die Chaperone nicht koexprimierte (0,006 mM IPTG). Die Helfermoleküle könnten das Protein in eine günstige Konformation überführen und damit seinen Transport und seine Faltungseffizienz verbessern. Durch die duale Expression könnte jedoch auch die Leistung jedes einzelnen Expressionssystems herabgesetzt werden. Die verlangsamte Bildung des Ausgangsproteins überschwemmt die Zelle nicht in gleichem Maß. Transport- und Faltungsvorgänge werden weniger behindert. Über die Zeit könnte sich eine größere Menge richtig prozessiertes und gefaltetes Protein bilden. Die Passagierdomäne eines Autotransporterproteins muss, wie von Jose *et al.* (1996) gezeigt wurde, im Periplasma ungefaltet oder als sterisch anspruchsloses Intermediat vorliegen, um durch das β -Fass auf die Oberfläche transportiert zu werden. Sobald sich ein Protein im ungefalteten oder missgefalteten Zustand im Periplasma befindet, ist es der Gefahr einer Degradation durch periplasmatische Proteasen ausgesetzt (Maurizi, 1992; Jose und Zangen, 2005). Eine Bindung an ein Chaperon kann der Proteolyse vorbeugen und das Protein bis zur Integration in die äußere Membran in einer faltungskompatiblen Konformation halten (Henderson *et al.*, 1998).

Mit dem pCOLA-Duet-1 System stand, neben dem pET-11d Vektor, ein weiteres Expressionsplasmid zur Verfügung. Beide Systeme werden von derselben Firma vertrieben (Novagen) und erlauben die Überexpression von Genen, die in die Multiple Cloning Site (MCS) eingesetzt werden. Das Plasmid pCOLA-Duet-1 trägt im Unterschied zu pET-11d unter anderem eine Kanamycin Resistenz in umgekehrter Orientierung zur MCS anstelle einer Ampicillin Resistenz in gleicher Orientierung, sein Vektorrückgrat ist um circa 2000 bp kleiner und es liegt in einer niedrigeren Kopienzahl in der Zelle vor. Das Gen, das für das Ausgangsprotein kodiert, wurde in die MCS von pCOLA-

Duet-1 kloniert. Der Wechsel des Systems zog keine Änderung in der Ausprägung beider Proteinformen nach sich. Auch die Zahl der an der Oberfläche präsentierten und markierbaren Passagierepitope änderte sich nicht. Aufgrund der Ähnlichkeit der Systeme wird die Proteinexpression in gleicher Weise beeinflusst. Als Alternative bietet sich die früher im Arbeitskreis durchgeführte Expression unter der Kontrolle des konstitutiven P_K -Promotors an (Klauser *et al.*, 1990; Maurer *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1999). Alle von diesem System exprimierten und untersuchten Autotransporterproteine zeigten nicht die für die induzierbaren Systeme typischen Doppelbanden. Die Bande, die detektiert werden konnte, war prozessiert und funktionell (Maurer *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1999). Sie lief im SDS-Gel auf gleicher Höhe wie die untere, funktionelle Bande ihrer induzierbaren Variante. Die Intensität der Proteinbande der konstitutiven Variante war der Intensität der unteren Bande der induzierbaren Variante zumindest gleich. Die Menge der oberflächenständigen, markierbaren Passagierepitopen der konstitutiven Variante überstieg die der induzierbaren um die Hälfte. Durch eine konstitutive Expression wurde die Integration und Faltung des Ausgangsproteins in die äußere Membran positiv beeinflusst. Es wurde, im Gegensatz zur induzierten Expression unter der Kontrolle der starken *T7lac* Promotors, nur funktionelles Protein gebildet. Durch die konstitutive Expression können die Zellen jedoch gegenüber Bakterien, die kein Protein bilden, im Wachstum benachteiligt sein. Wird beispielsweise ein für den Organismus toxisches Produkt während der kompletten Anzucht gebildet, wie es bei einer konstitutiven Expression der Fall wäre, kann die Lebensfähigkeit der Zellen eingeschränkt sein (Terpe, 2006). Im Laufe der Zeit können so die Varianten, die das Protein von Interesse bilden, verloren gehen. Diese Faktoren sprechen für die Beibehaltung des induzierbaren Systems, insbesondere nachdem die Proteinexpression soweit optimiert werden konnte, dass nur noch die funktionelle Proteinform gebildet wurde.

Zusammenfassend war es gelungen, durch eine Reduktion des Induktors IPTG den Promotor des induzierbaren Expressionssystems so zu steuern, dass ohne negative Beeinflussung der Menge an oberflächenständigem Passagier nur noch die prozessierte und funktionelle Variante des Ausgangsproteins gebildet wurde. Durch eine Koexpression der periplasmatischen Chaperone DsbA, DsbC, SurA und FkpA konnte der Transport und die Integration soweit verbessert werden, dass sich die Zahl oberflächenständiger Passagiere verdoppelte. Da eine Verknüpfung von Cysteinen zu Disulfidbindungen

im Periplasma, wie es DsbA und DsbC ermöglichen, den Transport eines Passagiers über die äußere Membran verhindern kann, sollte ein Vektor geschaffen werden, der nur noch die Chaperone SurA und FkpA kodiert. Dieser könnte universell koexprimiert werden, unabhängig von der Aminosäuresequenz eines Passagiers, und durch die Bildung einer größeren Menge periplasmatischer Chaperone einen möglichen Flaschenhals des Transportes umgehen oder verbessern.

9 Literatur

- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:361-398
- Baik SC, Kim KM, Song SM, Kim DS, Jun JS, Lee SG, Song JY, Park JU, Kang HL, Lee WK, Cho MJ, Youn HS, Ko GH, Rhee KH (2004) Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J Bacteriol* 186:949-955
- Baneyx F, Georgiou G (1990) In vivo degradation of secreted fusion proteins by the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J Bacteriol* 172:491-494
- Baneyx F, Georgiou G (1992) Degradation of secreted proteins in *Escherichia coli*. *Ann N Y Acad Sci* 665:301-308
- Baneyx F, Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22:1399-1408
- Bardwell JC (1994) Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol Microbiol* 14:199-205
- Bardwell JC, McGovern K, Beckwith J (1991) Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* 67:581-589
- Barnard TJ, Dautin N, Lukacik P, Bernstein HD, Buchanan SK (2007) Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat Struct Mol Biol* 14:1214-1220
- Benjelloun-Touimi Z, Sansonetti PJ, Parsot C (1995) SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol Microbiol* 17:123-135
- Benz I, Schmidt MA (1989) Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57:1506-1511
- Benz I, Schmidt MA (1992a) AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* 6:1539-1546
- Benz I, Schmidt MA (1992b) Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect Immun* 60:13-18
- Bieker KL, Silhavy TJ (1990) PrlA (SecY) and PrlG (SecE) interact directly and function sequentially during protein translocation in *E. coli*. *Cell* 61:833-842
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
- Bitto E, McKay DB (2003) The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. *J Biol Chem* 278:49316-49322

- Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1474
- Blocker AJ, Deane JE, Veenendaal AK, Roversi P, Hodgkinson JL, Johnson S, Lea SM (2008) What's the point of the type III secretion system needle? *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6507-6513
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113
- Bos MP, Robert V, Tommassen J (2007) Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* 61:191-214
- Bosch D (1986) Periplasmic accumulation of truncated forms of outer-membrane PhoE protein of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* 189:449-455
- Bowden GA, Paredes AM, Georgiou G (1991) Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 9:725-730
- Brandon LD, Goehring N, Janakiraman A, Yan AW, Wu T, Beckwith J, Goldberg MB (2003) IcsA, a polarly localized autotransporter with an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion, although the Sec apparatus is circumferentially distributed. *Mol Microbiol* 50:45-60
- Brunder W, Schmidt H, Karch H (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* 24:767-778
- Cascales E (2008) The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep* 9:735-741
- Chalmers JJ, Kim E, Telford JN, Wong EY, Tacon WC, Shuler ML, Wilson DB (1990) Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. *Appl Environ Microbiol* 56:104-111
- Charles I, Fairweather N, Pickard D, Beesley J, Anderson R, Dougan G, Roberts M (1994) Expression of the *Bordetella pertussis* P.69 pertactin adhesin in *Escherichia coli*: fate of the carboxy-terminal domain. *Microbiology* 140:3301-3308
- Christie PJ (2000) Bacterial type IV secretion: Conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* 8:354-360
- Cooper TF, Rozen DE, Lenski RE (2003) Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1072-1077
- Cordwell SJ (2006) Technologies for bacterial surface proteomics. *Curr Opin Microbiol* 9:320-329
- Cowan SW, Garavito RM, Jansonius JN, Jenkins JA, Karlsson R, Konig N, Pai EF, Pauptit RA, Rizkallah PJ, Rosenbusch JP, et al. (1995) The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form. *Structure* 3:1041-1050
- Craig L, Li J (2008) Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol* 18:267-277
- Dalbey RE (1985) Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Biol Chem* 260:15925

- Dalbey RE (1991) Leader peptidase. *Mol Microbiol* 5:2855-2860
- Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:317-364
- de Cock H, Struyve M, Kleerebezem M, van der Krift T, Tommassen J (1997) Role of the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* 269:473-478
- de Cock H, van Blokland S, Tommassen J (1996) In vitro insertion and assembly of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12 into the outer membrane. Role of Triton X-100. *J Biol Chem* 271:12885-12890
- Dubendorff JW, Studier FW (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* 219:45-59
- Economou A (1999) Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* 7:315-320
- Edman P (1949) A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem* 22:475
- Eisenberg D (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* 179:125
- Eslava C, Navarro-Garcia F, Czczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP (1998) Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 66:3155-3163
- Everest P, Li J, Douce G, Charles I, De Azavedo J, Chatfield S, Dougan G, Roberts M (1996) Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology* 142:3261-3268
- Fanghanel J, Fischer G (2004) Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Front Biosci* 9:3453-3478
- Fernandez RC, Weiss AA (1994) Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* 62:4727-4738
- Filip C, Fletcher G, Wulff JL, Earhart CF (1973) Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J Bacteriol* 115:717-722
- Filloux A, Hachani A, Bleves S (2008) The bacterial type VI secretion machine: Yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* 154:1570-1583
- Freudl R (1987) The signal sequence suffices to direct export of outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem* 262:66
- Freudl R, Schwarz H, Klose M, Movva NR, Henning U (1985) The nature of information, required for export and sorting, present within the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *Embo J* 4:3593-3598
- Garavito RM, Jenkins JA, Neuhaus JM, Pugsley AP, Rosenbusch JP (1982) Structural investigations of outer membrane proteins from *Escherichia coli*. *Ann Microbiol* 133:37-41

- Garavito RM, Rosenbusch JP (1980) Three-dimensional crystals of an integral membrane protein: an initial x-ray analysis. *J Cell Biol* 86:327-329
- Geertsma ER (2008) Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5722-5727
- Gentle IE, Burri L, Lithgow T (2005) Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Mol Microbiol* 58:1216-1225
- Gentschev I, Dietrich G, Goebel W (2002) The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* 10:39
- Georgiou G, Stephens DL, Stathopoulos C, Poetschke HL, Mendenhall J, Earhart CF (1996) Display of beta-lactamase on the *Escherichia coli* surface: outer membrane phenotypes conferred by Lpp'-OmpA'-beta-lactamase fusions. *Protein Eng* 9:239-247
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2:48-58
- Gram HC (1884) Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschr Med* 2:185-189
- Grodberg J, Dunn JJ (1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* 170:1245-1253
- Halter R, Pohlner J, Meyer TF (1984) IgA protease of *Neisseria gonorrhoeae*: isolation and characterization of the gene and its extracellular product. *Embo J* 3:1595-1601
- Handel S (2003) Entwicklung eines Ganzzell-Biokatalysators durch Autodisplay von Sorbitol Dehydrogenase. Dissertation:Universität des Saarlandes, Saarbrücken
- Hantke K (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Molecular and General Genetics* 182:288-292
- Hazes B, Frost L (2008) Towards a systems biology approach to study type II/IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta* 1778:1839-1850
- Heller KB (1978) Apparent molecular weights of a heat-modifiable protein from the outer membrane of *Escherichia coli* in gels with different acrylamide concentrations. *J Bacteriol* 134:1181-1183
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:692-744
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 6:370-378
- Hendrixson DR, de la Morena ML, Stathopoulos C, St Geme JW, 3rd (1997) Structural determinants of processing and secretion of the *Haemophilus influenzae* hap protein. *Mol Microbiol* 26:505-518
- Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J (2000) Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo J* 19:5989-5999
- Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:379

- Jackups R, Jr., Cheng S, Liang J (2006) Sequence motifs and antimotifs in beta-barrel membrane proteins from a genome-wide analysis: the Ala-Tyr dichotomy and chaperone binding motifs. *J Mol Biol* 363:611-623
- Jacob-Dubuisson F, Locht C, Antoine R (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* 40:306-313
- Jahnig F (1990) Structure predictions of membrane proteins are not that bad. *Trends Biochem Sci* 15:93-95
- Jose J, Bernhardt R, Hannemann F (2001) Functional display of active bovine adrenodoxin on the surface of *E. coli* by chemical incorporation of the [2Fe-2S] cluster. *ChemBioChem* 2:695-701
- Jose J, Bernhardt R, Hannemann F (2002) Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. *J Biotechnol* 95:257-268
- Jose J, Betscheider D, Zangen D (2005) Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. *Anal Biochem* 346:258-267
- Jose J, Chung JW, Jeon BJ, Maas RM, Nam CH, Pyun JC (2008) *Escherichia coli* with autodisplayed Z-domain of protein A for signal amplification of SPR biosensor. *Biosens Bioelectron*
- Jose J, Handel S (2003) Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry. *ChemBioChem* 4:396-405
- Jose J, Jahnig F, Meyer TF (1995) Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* 18:378-380
- Jose J, Kramer J, Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1996) Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene* 178:107-110
- Jose J, Meyer TF (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:600-619
- Jose J, von Schwichow S (2004a) Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *ChemBioChem* 5:491-499
- Jose J, von Schwichow S (2004b) "Cysteine tagging" for labeling and detection of recombinant protein expression. *Anal Biochem* 331:267-274
- Jose J, Zangen D (2005) Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 333:1218-1226
- Kane JF (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 6:95
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1990) Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *EMBO J* 9:1991-1999
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1992) Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport. *EMBO J* 11:2327-2335

- Kloser AW, Reading JT, McDermott T, Stidham R, Misra R (2001) Intragenic suppressors of an OmpF assembly mutant and assessment of the roles of various OmpF residues in assembly through informational suppressors. *J Bacteriol* 183:264-269
- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 37:239-253
- Konieczny MPJ, Benz I, Hollinderbaumer B, Beinke C, Niederweis M, Schmidt MA (2001) Modular organization of the AIDA autotransporter translocator: the N-terminal beta1-domain is surface-exposed and stabilizes the transmembrane beta2-domain. *Antonie van Leeuwenhoek* 80:19-34
- Lazar SW, Kolter R (1996) SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J Bacteriol* 178:1770-1773
- Lee SY, Choi JH, Xu Z (2003) Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol* 21:45-52
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2000) Brock Biology of Microorganisms. 9. Edition
- Maurer J (1998) Typ IV Sekretion: Charakterisierung des Proteinexports durch den Autotransporter AIDA-I in *Escherichia coli*. Dissertation:Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen
- Maurer J, Jose J, Meyer TF (1997) Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:794-804
- Maurer J, Jose J, Meyer TF (1999) Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol* 181:7014-7020
- Maurizi MR (1992) Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia* 48:178-201
- Meyer TF, Halter R, Pohlner J (1987) Mechanism of extracellular secretion of an IgA protease by gram-negative host cells. *Adv Exp Med Biol* 216B:1271-1281
- Missiakas D, Georgopoulos C, Raina S (1994) The *Escherichia coli* dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *Embo J* 13:2013-2020
- Miyazaki H, Yanagida N, Horinouchi S, Beppu T (1989) Characterization of the precursor of *Serratia marcescens* serine protease and COOH-terminal processing of the precursor during its excretion through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171:6566-6572
- Mogensen JE, Tapadar D, Schmidt MA, Otzen DE (2005) Barriers to folding of the transmembrane domain of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *Biochemistry* 44:4533-4545
- Muller D, Benz I, Tapadar D, Buddenborg C, Greune L, Schmidt MA (2005) Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface. *Infect Immun* 73:3851-3859
- Narita S, Tokuda H (2006) An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals. *FEBS Lett* 580:1164-1170

- Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (1999) Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng* 12:3-9
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10:1-6
- Nilsson B, Moks T, Jansson B, Abrahmsen L, Elmblad A, Holmgren E, Henrichson C, Jones TA, Uhlen M (1987) A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng* 1:107-113
- Novagen (2003) pET System Manual. Novagen
- Oliver DC, Huang G, Nodel E, Pleasance S, Fernandez RC (2003) A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol* 47:1367-1383
- Oomen CJ, van Ulsen P, van Gelder P, Feijen M, Tommassen J, Gros P (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* 23:1257-1266
- Owen P, Meehan M, de Loughry-Doherty H, Henderson I (1996) Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 16:63-76
- Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325:458-462
- Provence DL, Curtiss R, 3rd (1994) Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* 62:1369-1380
- Pugsley AP (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 57:50-108
- Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1528-1533
- Robert V, Volokhina EB, Senf F, Bos MP, Van Gelder P, Tommassen J (2006) Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol* 4:1984
- Rondot S, Koch J, Breitling F, Dubel S (2001) A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol* 19:75-78
- Rouviere PE, Gross CA (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* 10:3170-3182
- Rupprecht KR, Gordon G, Lundrigan M, Gayda RC, Markovitz A, Earhart C (1983) omp T: *Escherichia coli* K-12 structural gene for protein a (3b). *J Bacteriol* 153:1104-1106
- Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren PA, Stahl S (2002) Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol* 96:129-154
- Sandkvist M (2001) Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 40:271-283

- Schein CH (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/technology* 6:291-294
- Schlapschy M, Grimm S, Skerra A (2006) A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng Des Sel* 19:385-390
- Schmitt W, Haas R (1994) Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol* 12:307-319
- Schnaitman CA (1971a) Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolate cell walls of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 108:553-563
- Schnaitman CA (1971b) Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J Bacteriol* 108:545-552
- Schultheiss E, Paar C, Schwab H, Jose J (2002) Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli*. *J Mol Cat B Enz* 18:89-97
- Schultheiss E, Weiss S, Winterer E, Maas R, Heinzle E, Jose J (2008) Esterase autodisplay: enzyme engineering and whole-cell activity determination in microplates with pH sensors. *Appl Environ Microbiol* 74:4782-4791
- Schweizer M, Hindennach I, Garten W, Henning U (1978) Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane. Interaction of protein II with lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 82:211-217
- Shevchik VE, Condemine G, Robert-Baudouy J (1994) Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. *Embo J* 13:2007-2012
- Shikata S, Shimada K, Kataoka H, Horinouchi S, Beppu T (1992) Detection of large COOH-terminal domains processed from the precursor of *Serratia marcescens* serine protease in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Biochem* 111:627-632
- Sklar JG (2007) Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 21:2473-2484
- Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-1317
- St Geme JW, 3rd, Cutter D, Barenkamp SJ (1996) Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J Bacteriol* 178:6281-6287
- Stein M, Kenny B, Stein MA, Finlay BB (1996) Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol* 178:6546-6554
- Strandberg L, Enfors SO (1991) Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 57:1669-1674
- Struyvé M, Moons M, Tommassen J (1991) Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* 218:141-148

- Studier FW (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219:37-44
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185:60-89
- Sugawara E, Steiert M, Rouhani S, Nikaido H (1996) Secondary structure of the outer membrane proteins OmpA of *Escherichia coli* and OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 178:6067-6069
- Suhr M, Benz I, Schmidt MA (1996) Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA_c and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol Microbiol* 22:31-42
- Surolia A (1982) Protein A: nature's universal anti-antibody. *TIBS* 7:74-76
- Suzuki T, Lett MC, Sasakawa C (1995) Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J Biol Chem* 270:30874-30880
- Talker-Huiber D, Jose J, Glieder A, Pressnig M, Stubenrauch G, Schwab H (2003) Esterase EstE from *Xanthomonas vesicatoria* (Xv_EstE) is an outer membrane protein capable of hydrolyzing long-chain polar esters. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:479-487
- Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:211-222
- Tommassen JJ (2007) Getting into and through the outer membrane. *Science* 317:903
- van Dijl JM, de Jong A, Smith H, Bron S, Venema G (1991) Signal peptidase I overproduction results in increased efficiencies of export and maturation of hybrid secretory proteins in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 227:40-48
- van Ulsen P, van Alphen L, Hopman CT, van der Ende A, Tommassen J (2001) In vivo expression of *Neisseria meningitidis* proteins homologous to the *Haemophilus influenzae* Hap and Hia autotransporters. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32:53-64
- Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS (1996) Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* 14:309-314
- Veiga E (2002) Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *EMBO J* 21:2122-2131
- von Heijne G (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* 133:17-21
- Voulhoux R, Tommassen J (2004) Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Res Microbiol* 155:129-135
- Watson N (1988) A new revision of the sequence of plasmid pBR322. *Gene* 70:399-403
- Wentzel A, Christmann A, Kratzner R, Kolmar H (1999) Sequence requirements of the GPNG beta-turn of the *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. *J Biol Chem* 274:21037-21043

- Werner J (2005) YaeT (Omp85) affects the assembly of lipid-dependent and lipid-independent outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 57:1450-1459
- Wilhelm S, Rosenau F, Becker S, Buest S, Hausmann S, Kolmar H, Jaeger KE (2007) Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chembiochem* 8:55-60
- Zverev VV, Khmel IA (1985) The nucleotide sequences of the replication origins of plasmids ColA and ColD. *Plasmid* 14:192-199

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

*	Deletion einer Aminosäure
A	Alanin
AIDA-I	Adhesin involved in diffuse adherence
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
CTxB	Choleratoxin B Untereinheit
<i>dam</i>	Gen, das für die DNA-Adenin-Methylase kodiert
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleosid
DTT	Dithiothreitol
Dü 142	Monoklonaler Antikörper gegen ein lineares Epitop (PEYFK)
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
IgG	Immunglobulin G

IM	Inner membrane
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K	Lysin
kDa	Kilodalton
L	Leucin
LB	Luria Bertani
M	Molar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MCS	Multiple cloning site
mF	Mittlere Fluoreszenz
m-RNA	messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
OM	Outer membrane
OmpA	Outer membrane protein A
OmpF/C	Outer membrane protein F/C
OmpT	Outer membrane protein T
<i>ompT</i>	Gen, das für die Protease OmpT kodiert
ori	Origin of replication
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPlasen	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen
PPM	Proteose-Pepton-Medium
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur

S	Serin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP	Signalpeptid
T	Threonin
TA	Tris/Acetat-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TOF	Time of Flight
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

10.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Autotransporterproteins, wie es im Autodisplay System eingesetzt wird	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Autodisplays	17
Abbildung 3: Schema der ortsgerichteten Mutagenese nach QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene	44
Abbildung 4: Model des β -Fasses	59
Abbildung 5: Expression und Membranständigkeit der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S.	61
Abbildung 6: Oberflächenständigkeit eines Epitops als Passagierdomäne der Mutante K1008R-I1013R-R1210E-R1212S in <i>E. coli</i> UT5600(DE3)	62
Abbildung 7: Expression und Membranständigkeit der Mutante E21G	65
Abbildung 8: Oberflächenständigkeit eines linearen Epitops als Passagier der Mutante E21G	66
Abbildung 9: Auftrennung der Außenmembranproteine für die LC-MS mit Hilfe der SDS-PAGE	70
Abbildung 10: Massenspektrometrische Analyse des C-Terminus des Ausgangsproteins	71
Abbildung 11: Massenspektrometrische Analyse des C-Terminus der Mutante F485*	71
Abbildung 12: Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in <i>E. coli</i> UT5600(DE3).	73
Abbildung 13: Oberflächenständigkeit eines linearen Epitops als Passagier des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in <i>E. coli</i> UT5600(DE3)	75
Abbildung 14: Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in <i>E. coli</i> BL21(DE3).	77
Abbildung 15: Oberflächenständigkeit eines linearen Epitops als Passagier des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	79

Abbildung 16: Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in <i>E. coli</i> JK321(DE3).	81
Abbildung 17: Oberflächenständigkeit eines linearen Epitops als Passagier des Ausgangsproteins und seiner C-terminalen Mutanten in <i>E. coli</i> JK321(DE3)	83
Abbildung 18: Nachweis von zwei Expressionsformen des Ausgangsproteins im Außenmembranproteinisolat von <i>E. coli</i> UT5600(DE3)pET-SH3	84
Abbildung 19: Bestimmung des Molekulargewichtes der beiden Expressionsformen des Ausgangsproteins mit Hilfe der GelProAnalyzer Software	85
Abbildung 20: Unterschiedliche Hitzedenaturierbarkeit der beiden Formen des Ausgangsprotein	86
Abbildung 21: Unterschiedliche Hitzedenaturierbarkeit der beiden Formen der Mutante F485V	88
Abbildung 22: Ganzzellverdau als Nachweis der Oberflächenständigkeit der funktionellen Form des Ausgangsproteins	90
Abbildung 23: Struktur des Ausgangsproteins mit Proteaseschnittstellen	91
Abbildung 24: Einfluss der außenmembranständigen Protease OmpT von <i>E. coli</i> DH5 α (DE3) auf die beiden Formen des Ausgangsproteins und seiner carboxyterminalen Mutanten	92
Abbildung 25: Nachweis des oberflächenständigen Teils des Ausgangsproteins im Überstand von <i>E. coli</i> DH5 α (DE3) nach Prozessierung durch die Protease OmpT	94
Abbildung 26: Nachweis der Prozessierung des Passagiers des Ausgangsproteins durch die außenmembranständige Protease OmpT in <i>E. coli</i> DH5 α (DE3)	95
Abbildung 27: Unterschiedliche Löslichkeit der beiden Formen des Ausgangsproteins im Detergenz N-Lauryl-Sarcosinat-Natrium	97
Abbildung 28: Mögliche Sequenzen des N-Terminus des Ausgangsproteins nach einem Edman Abbau	100
Abbildung 29: Nachweis der beiden unterschiedlichen Prozessierungsvarianten für ein Ausgangsprotein mit der ursprünglichen Signalpeptidaseschnittstelle und einem anderen Passagier	102
Abbildung 30: Nachweis beider Proteinformen in <i>E. coli</i> UT5600(DE3), die die Z-Domäne auf der Oberfläche exprimieren	104
Abbildung 31: Oberflächenständigkeit der Z-Domäne	105
Abbildung 32: Quantifizierung der oberflächenständigen Z-Domänen mittels Antikörpertitration	106
Abbildung 33: Einfluss einer konstitutiven Proteinexpression auf die Expressionsstärke und die Membranständigkeit des Ausgangsproteins	109
Abbildung 34: Oberflächenständigkeit eines Epitops als Passagierdomäne des Ausgangsproteins nach konstitutiver und induzierter Proteinexpression	110
Abbildung 35: Einfluss eines anderen induzierbaren Expressionssystems auf Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins	112
Abbildung 36: Einfluss eines anderen induzierbaren Expressionssystems auf die Oberflächenständigkeit eines Passagiers des Ausgangsproteins	113
Abbildung 37: Vergleich der Expression und der Membranständigkeit der beiden Formen des Ausgangsprotein bei 29 und 37 °C	115
Abbildung 38: Einfluss der Induktionstemperatur auf die Oberflächenständigkeit eines Passagiers des Ausgangsproteins	115
Abbildung 39: Einfluss der Induktionszeit auf Expression und Membranständigkeit der beiden Formen des Ausgangsproteins	117

Abbildung 40: Einfluss der Induktionszeit auf die Oberflächenständigkeit eines Passagiers des Ausgangsproteins	118
Abbildung 41: Einfluss der IPTG-Konzentration (0,0001-0,1 mM) auf Expression und Membranständigkeit der beiden Formen des Ausgangsproteins	120
Abbildung 42: Einfluss der IPTG-Konzentration (0,0001-0,1 mM) auf die Oberflächenständigkeit eines Passagiers des Ausgangsproteins	121
Abbildung 43: Einfluss koexprimierter Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen und PPIasen auf die Expression und Membranständigkeit des Ausgangsproteins	124
Abbildung 44: Einfluss der IPTG-Konzentration auf Expression und Membranständigkeit der beiden Formen des Ausgangsproteins bei gleichzeitiger Koexpression mehrerer Chaperone	126
Abbildung 45: Einfluss koexprimierter Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen und PPIasen auf die Oberflächenständigkeit eines Epitops als Passagier des Ausgangsproteins	127

10.3 Publikationen

10.3.1 Zeitschriftenbeiträge

Schultheiss E, Weiss S, Winterer E, Maas R, Heinzle E, Jose J (2008) Esterase autodisplay: enzyme engineering and whole-cell activity determination in microplates with pH sensors. *Appl Environ Microbiol* 74:4782-4791

Jose J, Winterer E, Nam CH, Pyun JC (2009) Assays of Autodisplayed Z-Domain of Protein A (Manuskript eingereicht)

Winterer E, Jose J Autodisplay: The role of the carboxyterminal phenylalanine in outer membrane insertion and passenger display (Manuskript in Vorbereitung)

10.3.2 Tagungsbeiträge

Jose J, Winterer E, Handel S (2003) Synthesis of rare sugars by whole cells of *E. coli* using Autodisplay of Sorbit Dehydrogenase. Annual Meeting "Frontiers in Medicinal Chemistry", Fulda

Winterer E, Handel S, Jose J (2003) A whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars obtained by Autodisplay of sorbit dehydrogenase in *E. coli*. DPhG-Jahrestagung, Würzburg

Jose J, Winterer E, von Schwichow S (2004) A whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars obtained by autodisplay of a polyol dehydrogenase in *E. coli*. BioPerspectives, Wiesbaden

Winterer E, von Schwichow S, Jose J (2004) A whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars obtained by Autodisplay of a polyol dehydrogenase in *E. coli*. ETTT-Tagung, Saarbrücken

Jose J, Müller E, Heinzle E, Weiss S, Winterer E (2005) Autodisplay for the rational and evolutive design of esterases. *Frontiers in medicinal chemistry*, Leipzig

Winterer E, Müller E, Weiss S, Heinzle E, Jose J (2005) Autodisplay und Entwicklung maßgeschneiderter Esterasen. Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Winterer E, Schu M, Scheidig AJ, Jose J (2006) Structural and functional investigations on the transport domains of the Autodisplay system. DPhG-Doktorandentagung, Heroldsberg (Nürnberg)

Winterer E, Schultheiss E, Weiss S, Maas R, Heinzle E, Jose J (2007) Esterase Autodisplay: enzyme engineering and whole cell activity determination by microplates with pH-sensors. Pharmaceutical Sciences World Congress Pre-Satellite Meeting, Amsterdam

10.3.3 Preise

Jose J, Winterer E, Handel S (2003) Synthesis of rare sugars by whole cells of *E. coli* using Autodisplay of Sorbit Dehydrogenase. Posterpreis beim Annual Meeting "Frontiers in Medicinal Chemistry", Fulda

