



Elisa Winterer (Autor)
**Untersuchungen zur Struktur und Funktion der
Transportdomänen des Autodisplay Systems**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/858>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

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