

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