



Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Molekulare Strukturbiologie



**Mutation, Expression und Rückfaltung von Omp32 aus
Delftia acidovorans sowie Sequenzierung und
Untersuchung des Porin-assoziierten Proteins (PAP)**

Erik Roth

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwigs-Maximilian-Universität München

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

München, eingereicht am 1. März 2005

Beteiligte Honoratioren:

Herr Prof. V. Müller (Prüfer, Gutachter, Umlauf)

Frau Prof. K. Jung (Prüfer, Gutachter, Umlauf)

Herr Prof. M. Parniske (Prüfer, Umlauf)

Herr Prof. G. Wanner (Prüfer, Umlauf)

Herr Prof. T. Cremer (Umlauf)

Herr Prof. C. David (Umlauf)

Herr PD. Dr. H. Engelhardt (Sondergutachter, Sonderprüfer)

Die mündliche Prüfung erfolgte am 17.6.2005.

Danksagung

Tiefempfundene Dankesworte gebühren folgenden Personen:

An Herrn Prof. **W. Baumeister** für die Möglichkeit, in seiner Abteilung die vorliegende Promotionsarbeit durchgeführt zu haben, sowie für seine andauernde Unterstützung;

An Herrn Prof. **V. Müller**, der obwohl er nicht mehr Professor an der LMU ist, sich dennoch bereit erklärt hat, die offizielle Betreuung und Korrektur dieser Arbeit zu übernehmen;

An Herrn **H. Engelhardt** für die Aufgabenstellung, die Betreuung der Arbeit, die Diskussionen, die Vorschläge, die Anmerkungen, den Ausblick, die Visionen, die Hilfestellungen, die Erklärungen, die investierte Zeit und Arbeit...;

An die Drs. **S. Witt**, **J. Peters** und **P. Zwickl** für ihre offenen Ohren für alle Fragen und den damit zusammenhängenden Sachverstand in allen molekularbiologischen und protein-biochemischen Fragen und Angelegenheiten.

An **J. Lubieniecki** für seine Hilfe im Labor und seine freundliche, zuvorkommende und äußerst angenehme Gegenwart. Zudem führt er die Aufreinigungen und Rückfaltungen von rekombinantem Omp32 mit großem Erfolg fort, was mich mit mindestens ebenso großer Freude beseelt;

An **U. Zachariae** und **T. Klühspies** für die tolle Promotionszeit, die ich mit beiden erleben durfte. Die dazugekommenen Eindrücke in ihre Bereiche haben meinen Horizont deutlich erweitert. Ebenso darf ich mich bei beiden für die tolle Zusammenarbeit, aber auch für die herausragende Atmosphäre bedanken;

An **A. Gerega**, **C. Kofler** und **M. Boicu**, die mir indirekt Kraft gegeben haben über das Vertrauen, das sie mir persönlich und wissenschaftlich geschenkt haben. Besonderer Dank gebührt dabei nochmals **A. Gerega**, die mit einem durchaus kritischen Auge diese Arbeit gegengelesen hat und dabei eine Vielzahl guter Vorschläge zur Verbesserung aufbrachte;

An **K. Rohdewald**, **E. Weyher** und **B. Haas** für Ihre Hilfsbereitschaft und Kooperation in Zusammenhang mit den direkten Genomsequenzierungen von PAP, den CD-Messungen von rückgefaltetem rekombinantem Omp32, bzw. den Radioaktivitätsexperimenten;

An **S. von Polenz** für die Freundschaft, die zwischen uns entstanden ist und die Gespräche, Ereignisse und sonstigen „Tratsch“, den wir beim Mittagessen ausgetauscht haben;

An die restlichen Mitarbeiter und Doktoranden der Abteilung Baumeister, die zusammen ein echtes „Wohlfühl-Gefühl“ mit Freundschaft und Hilfsbereitschaft geschaffen haben;

An meine Eltern und Brüder für Ihre andauernde und vorbehaltlose Unterstützung, die herausragende Ausbildung, die sie mir ermöglicht haben, sowie die ganzen angenehme Stunden im Kreis meiner „Großfamilie“;

An meine kleine Familie für alles, was sie sind, mir bedeuten, mir gegeben haben, an dem ich teilhaben durfte und hoffentlich noch lange ein langes, glückliches Leben teilhaben darf.

Formalia

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde.

München, Freitag, 8. Juli 2005

.....
(Erik Roth)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich weder anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg NICHT unterzogen habe, noch ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, Freitag, 8. Juli 2005

.....
(Erik Roth)

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Erik Oliver Roth
Röntgenstr.17
82152 Martinsried
geb. 10.08.1975, München
verheiratet, ein Kind
römisch-katholisch

Schulbildung:

1981 - 1985	Grundschule Hohenbrunn/Riemerling
1985 - 1994	Gymnasium Ottobrunn Leistungskurse Mathematik und Physik
07/1994	Abitur, Note: 1,8

Biologiestudium:

10/1994	Beginn des Studiums der Biologie an der LMU-München mit Ziel Diplombiologe
08/1996	Vordiplom, Note: 2,8
10/1996	Wechsel des Studienganges zur Technischen Biologie an der Universität Stuttgart, Einstieg in das 2. Fachsemester
10/1997	Hauptstudium Schwerpunkt : Technische Biochemie, Bioenergetik Nebenfächer : Industrielle Genetik und Bioverfahrenstechnik
04/1998	Stuttgarter Vordiplom in Technischer Biologie, Note: 1,7
08/1998 - 10/1998	Industriepraktikum, Fa. Roche/Penzberg (Zellfermentation)
11/1998 - 04/2000	Hilfswissenschaftler an verschiedenen Instituten der Biologie
03/1999 - 08/1999	Studienarbeit, Fa. Merck/Darmstadt (prämierte Arbeit)
04/2000 - 01/2001	Diplomarbeit, Universität Stuttgart, Abt. Bioenergetik
03/2001	Universitätsabschluss zum Diplombiologen, Note: 1,2

Promotion in Biologie:

04/2001 – 02/2005	Promotionsarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, Abt. Molekulare Strukturbiologie
-------------------	---

Inhaltsangabe

1	ZUSAMMENFASSUNG	11
2	TABELLEN UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	13
3	EINLEITUNG.....	15
3.1	Proteine der äußeren Membran.....	15
3.2	Omp32 – ein Porin mit außergewöhnlichen Eigenschaften	21
3.3	Porin-assoziiertes Protein (PAP).....	26
4	MATERIALIEN UND METHODEN.....	28
4.1	Molekularbiologie, allgemein	28
4.1.1	Verwendete Bakterienstämme.....	28
4.1.2	Verwendete Plasmide	29
4.1.3	Isolation von genomischer DNA aus <i>D. acidovorans</i>	29
4.1.4	Isolation von plasmidischer DNA	30
4.1.5	Restriktionsverdau genomischer DNA.....	30
4.1.6	Analytischer Endonukleasenverdau von DNA	31
4.1.7	Quantitativer Endonukleasenverdau von DNA	31
4.1.8	Dephosphorylierung geschnittener plasmidischer DNA	32
4.1.9	DNA-Agarosegelelektrophorese	32
4.1.10	Geextraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
4.1.11	Ligationen mit TOPO-Vektoren.....	34
4.1.12	Ligationen mit nicht-TOPO-Vektoren	34
4.1.13	Konstruktion von PCR-Primern	35
4.1.14	Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen.....	36
4.1.15	Transformation	36
4.2	Molekularbiologie Omp32	37
4.2.1	PCR zur Gewinnung von <i>omp32</i> aus genomischer DNA	37
4.2.2	Mutagenese mit pALTER Kit	37
4.2.3	Mutagenese mit Quikchange Kit.....	40
4.3	Molekularbiologie PAP.....	42
4.3.1	Konstruktion von degenerierten PCR-Primern	42
4.3.2	PCR aus recyclierter verdauter genomischer DNA zur PAP-Isolation	45
4.3.3	„Nested PCR“ zur PAP-Isolation.....	47

4.3.4	PCR zur Isolierung von PAP über Zwischensequenzen	48
4.3.5	Direkte Sequenzierung von PAP aus genomischer DNA	49
4.3.6	Gen-Fishing mit dem WalkerKit.....	51
4.4	Analyse von Proteinen	54
4.4.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	54
4.4.2	SDS-PAGE.....	55
4.4.3	Coomassie Brilliant Blue R250 zur Färbung von Acrylamidgelen.....	56
4.4.4	Silberfärbung von Acrylamidgelen	57
4.4.5	Tryptophan-Emissionspektroskopie	57
4.4.6	FTIR-Spektroskopie	58
4.4.7	CD-Spektroskopie	58
4.5	Proteinproduktion und Aufreinigung	59
4.5.1	Expression	59
4.5.2	Isolation der Inclusion-Bodies	59
4.5.3	Kationenaustauschchromatographie.....	59
4.5.4	Analytische Gelchromatographie.....	60
4.5.5	Präparative Gelchromatographie.....	61
4.5.6	Detergensextraktionen.....	61
4.6	Rückfaltungen.....	62
4.6.1	Omp32 solubilisiert in SDS.....	62
4.6.2	Omp32 solubilisiert in Guanidiniumchlorid	62
4.6.3	Omp32 solubilisiert in Harnstoff.....	63
4.6.4	Mehrparameter-Tests zur Optimierung.....	63
4.6.5	Dialysen, Umpufferung.....	64
4.7	Malat-Bindungstest	66
4.8	Leitfähigkeitsmessungen.....	68
4.9	Theoretische Untersuchungen.....	70
4.9.1	DNA-Analyseprogramme	70
4.9.2	Protein-Analyseprogramme	70
5	ERGEBNISSE.....	71
5.1	Omp32	71
5.1.1	Klonierung aus dem Genom von <i>D. acidovorans</i>	71
5.1.2	Mutagenese.....	73
5.1.3	Expression	75
5.1.4	Aufreinigung	78
5.1.5	Rückfaltung	84
5.1.6	Trimerisierung.....	96
5.1.7	Nachweis einer Malat-Bindung an Omp32.....	100
5.1.8	Leitfähigkeitsmessungen an Omp32	102

5.2	PAP	106
5.2.1	Identifizierung der Gensequenz und der Primärstruktur	106
5.2.2	Identifizierung der 3D-Struktur	113
6	DISKUSSION	118
7	ANHANG	131
7.1	Verwendete Abkürzungen	131
7.2	Verwendete Oligonukleotide	134
7.3	Verwendete Puffer und Lösungen	136
7.4	Verwendete Geräte	137
7.5	Verwendete Chemikalien und Enzyme	139
8	LITERATUR	141

1 Zusammenfassung

Das Porin Omp32 ist das dominante porenbildende Protein in der äußeren Membran des Bakteriums *Delftia acidovorans*. Es weist die höchste Anionenselektivität aller bisher untersuchten Porine auf. Röntgenstrukturanalyse und elektrostatische Untersuchungen des Porins ermöglichten es, die Bedeutung der Kanal-bildenden Aminosäuren für die Funktion zu berechnen. Dabei stellte sich heraus, dass die Art der Aminosäuren sowie deren Anordnung im Inneren des Kanals verantwortlich für die ungewöhnlichen Eigenschaften von Omp32 sind.

Es wird vermutet, dass hauptsächlich eine als „Arginin-Cluster“ bezeichnete Formation aus fünf geladenen Aminosäuren die hohe Anionenselektivität von Omp32 bewirkt. Die Ladungen der drei positiv geladenen Arginine wird durch zwei versteckt liegende Glutamate stabilisiert. Um die Gültigkeit dieser theoretischen Vorhersage experimentell überprüfbar zu machen, wurden in der hier vorliegenden Arbeit gezielte Mutationen der fünf Aminosäuren des Arginin-Clusters von Omp32 eingeführt. Ziel war es, diese Mutanten inklusive eines rekombinanten Wildtyps zu exprimieren, in die natürliche Konformation zurückzufalten und anschließend zu trimerisieren.

Dafür wurde das Gen von Omp32 über PCR aus dem Genom von *D. acidovorans* isoliert und in einen Expressionsstamm unter IPTG-Kontrolle kloniert. Insgesamt wurden 16 verschiedene Mutanten generiert, die Variationen der fünf zugrundeliegenden Aminosäuren darstellen. Um die Veränderungen in den späteren Leitfähigkeitsmessungen besser mit den theoretischen Daten korrelieren zu können und dabei gleichzeitig den Porenquerschnitt nur geringfügig zu ändern, wurden Mutationen von Arginin zu Glutamin oder Glutamat, bzw. von Glutamat zu Arginin, Aspartat oder Glutamin durchgeführt.

Die entsprechenden Proteine wurden in *E. coli* heterolog als Inclusion-Bodies produziert, da aus früheren Experimenten bekannt war, dass bereits eine basale Expression von korrekt gefaltetem und membranständigen Omp32 toxische Effekte für die Wirtszelle erzeugt. Die anschließende Aufreinigung der gelösten Proteine erfolgte zunächst mittels Ionenaustauschchromatographie. Die daran angeschlossenen Rückfaltungen und Trimerisierungen der einzelnen Mutanten verliefen nicht quantitativ und die gewünschten Trimere konnten nicht weiter aufgereinigt werden. Der Grund hierfür lag in der langen Verweildauer von Omp32 in hochmolearem Harnstoff, die insbesondere eine spätere Trimerisierung unmöglich machte.

Aus diesem Grunde wurde die Reinigungsprozedur vollständig überarbeitet. Eine Methode, die eine Entfernung von Fremdproteinen aus den Inclusion-Bodies nur über die Verwendung verschiedener Detergenzien erzielte, erwies sich als sehr wirkungsvoll. Erstmals wird dafür kein chromatographischer Schritt verwendet, lagen die erzielbaren Reinheitsgrade mit dieser Methode bei Omp32 höher als über chromatische Schritte. Das gereinigte Porin konnte in mehreren Ansätzen so rückgefaltet werden, dass der Überstand nur trimeres Protein enthielt.

Leitfähigkeitsmessungen mit in planare Lipidmembranen inseriertem, rekombinanten Omp32 ergaben gleiche Werte wie für nativ isoliertes Omp32. Dies kann als funktioneller Nachweis für den Erfolg der Reinigungs- und Rückfaltungsmethode angesehen werden. Zudem ließ sich mit dieser Methode nachweisen, dass Omp32 eine Bindungsstelle für Malat besitzt, also spezifisch für organische Säuren ist. Dies steht im Gegensatz zur bisherigen Auffassung, dass Porine mit 16 β -Strängen ausschließlich allgemeine Diffusionscharakteristiken aufweisen. Die funktionelle Einteilung der Proteine der äußeren Membran anhand der Anzahl ihrer β -Stränge ist somit zu hinterfragen.

In der ursprünglichen Kristallstruktur von Omp32 wurde an dessen periplasmatischer Oberfläche ein Stück eines Proteins identifiziert, das nach Aminosäuresequenzierung eine Länge von 54 Aminosäuren hatte und als PAP (Porin-assoziiertes Protein) identifiziert wurde. Die Suche nach Sequenz-homologen Proteinen lieferte jedoch nur Ergebnisse für Proteine mit etwa 200 Aminosäuren.

In dieser Arbeit konnte auf molekularbiologischem Weg die Gensequenz von PAP ermittelt und mit einer prozessierten Gesamtlänge von 197 Aminosäuren in Einklang mit anderen homologen Proteinen gebracht werden. Dabei zeigte sich eine deutliche Unterteilung von PAP in zwei Domänen. Die N-terminale Domäne bindet, wie bereits aus der Kristallstruktur bekannt war, an die periplasmatische Seite von Omp32. Die C-terminale Domäne geht sehr wahrscheinlich eine stabile Verbindung mit Bestandteilen der Peptidoglykan-Schicht der Zellwand ein. Die Aminosäuresequenz von PAP konnte mithilfe von 3D-Strukturvorhersageprogrammen so modelliert werden, dass für mehr als 100 Aminosäuren der C-terminalen Domäne die Faltungsstruktur mit großer Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden kann.

2 Tabellen und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1:	<i>Schematischer Aufbau der äußeren Membran von Escherichia coli</i>	16
Abbildung 3.2:	<i>Porinklassen von Gram-negativen Bakterien</i>	20
Abbildung 3.3:	<i>Darstellung der Porendurchmesser von bekannten Porinen</i>	22
Abbildung 3.4:	<i>I-U-Charakteristik von Omp32</i>	23
Abbildung 3.5:	<i>Darstellung von Omp32</i>	25
Abbildung 4.6:	<i>Mutagenese nach der Quikchange Methode</i>	40
Abbildung 4.7:	<i>Schematische Darstellung der DNA-Identifizierung über Walker Kit</i>	52
Abbildung 4.8:	<i>Prinzipieller Versuchsaufbau der Leitfähigkeitsmessungen</i>	69
Abbildung 4.9:	<i>Konstruktion einer Hälfte der Messkammer</i>	69
Abbildung 5.1:	<i>PCR zur omp32-Isolation über genomische DNA aus Agaroseplugs</i>	71
Abbildung 5.2:	<i>PCR zur omp32-Isolation aus geschnittener frisch isolierter genomischer DNA, unter Variation der DMSO-Konzentration</i>	72
Abbildung 5.3:	<i>Plasmidkarte von pET17b-Omp32</i>	73
Abbildung 5.4:	<i>Beispielhafte PCR zur Mutagenese von pET17b-Omp32</i>	74
Abbildung 5.5:	<i>Expression von rWT in E. coli BL21(DE3) pLysS</i>	76
Abbildung 5.6:	<i>Expression von rWT in E. coli BL21(DE3) Rosetta</i>	77
Abbildung 5.7:	<i>Beispielhafte Kationenaustauschchromatographie von rWT</i>	80
Abbildung 5.8:	<i>Aufreinigungsverluste und Ausbeuten nach Ausfällung von Omp32-rWT durch Aceton</i>	81
Abbildung 5.9:	<i>Flussschema zur Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie</i>	82
Abbildung 5.10:	<i>Über Kationenaustauschchromatographie aufgereinigte Omp32-Derivate</i>	82
Abbildung 5.11:	<i>Über differentielle Detergenswaschschritte aufgereinigte Omp32-Derivate</i>	83
Abbildung 5.12:	<i>Flussschema zur Aufreinigung der Inclusion-Bodies über differenziellen Detergenzien-Einsatz</i>	84
Abbildung 5.13:	<i>Einfluss der Dialysen auf die Proteinkonzentration</i>	86
Abbildung 5.14:	<i>Flussschema zur Rückfaltungs-/Trimerisierungsansätzen mit GuaHCl</i>	87
Abbildung 5.15:	<i>Großer Rückfaltungsansatz von Omp32-rWT mit DDM über Dialyse</i>	88
Abbildung 5.16:	<i>FTIR-Messungen von nativem und rekombinatem Omp32</i>	89
Abbildung 5.17:	<i>Einfluss von ddH₂O auf die FTIR-Messungen</i>	89
Abbildung 5.18:	<i>CD-Spektrum von rWT zur Verifikation der korrekten Sekundärstruktur nach Rückfaltungsansätzen</i>	90
Abbildung 5.19:	<i>Flussschema zur Rückfaltung/Trimerisierung mittels SDS-denaturiertem Omp32</i>	92
Abbildung 5.20:	<i>Omp32-Derivate vor, unmittelbar nach und 14 Tage nach Beginn der jeweiligen Dialysen im präparativen Maßstab</i>	93

Abbildung 5.21:	<i>Flussschema zur anfänglichen Rückfaltung/Trimerisierung mit Harnstoff</i>	94
Abbildung 5.22:	<i>Flussschema zur Rückfaltung/Trimerisierung mit Harnstoff-denaturiertem Omp32</i>	96
Abbildung 5.23:	<i>Gelchromatographie mit Superdex200 von Dodecylmaltosid-rückgefaltetem rWT im analytischen Maßstab</i>	97
Abbildung 5.24:	<i>Gelchromatographie von Omp32-Q1 im präparativen Maßstab</i>	98
Abbildung 5.25:	<i>vollständige Trimerisierungen von Omp32-Derivaten nach Rückfaltung von Detergens-aufgereinigten Proteinen im analytischen Maßstab</i>	99
Abbildung 5.26:	<i>Trimerisierungsansätze von Detergens-aufgereinigten Omp32-Derivaten</i>	99
Abbildung 5.27:	<i>Nachweis der vollständigen Trimerisierung von mehreren präparativ zurückgefalteten Omp32-Derivaten</i>	100
Abbildung 5.28:	<i>Messergebnisse aus dem Malat-Bindungstest</i>	101
Abbildung 5.29:	<i>Leitfähigkeitsmessung von Omp32-rWT bei 500 mM Na-Malat</i>	102
Abbildung 5.30:	<i>Histogramm der absoluten Häufigkeiten der Stromstufen für natives Omp32 (blau) und rekombinantes Omp32 (rot)</i>	103
Abbildung 5.31:	<i>Theoretische und experimentell gemessene Durchgangskinetiken für KCl, Na-Malat und K-Oxalat durch Omp32</i>	104
Abbildung 5.32:	<i>Erste PCR zur Generierung eines DNA-Stückes komplementär zur bekannten kurzen Aminosäuresequenz</i>	106
Abbildung 5.33:	<i>PCR-Produkte aus der Walker-PCR der unterschiedlich verdauten genomischen DNA aus <i>D. acidovorans</i></i>	107
Abbildung 5.34:	<i>Nested PCR von recyclisierten genomischen DNA-Fragmenten aus <i>D. acidovorans</i></i>	108
Abbildung 5.35:	<i>Schema zur Sequenzierung von PAP und seiner Strukturelemente</i>	108
Abbildung 5.36:	<i>Verwendung der einzelnen Nukleotide in PAP-codierenden Triplets</i> ...	112
Abbildung 5.37:	<i>3D-Strukturmodell von RmpM aus <i>N. meningitidis</i>, Vorhersage durch EsysPred</i>	114
Abbildung 5.38:	<i>3D-Strukturvorhersagen von RmpM</i>	116
Abbildung 5.39:	<i>3D-Strukturvorhersagen von PAP</i>	117

3 Einleitung

3.1 Proteine der äußeren Membran

Bakterien besitzen wie alle biologischen Zellen Membransysteme, die sie von der Umwelt abgrenzen, bzw. in eukaryontischen Zellen zusätzlich definierte Reaktionsräume bilden. Viele bakterielle Arten besitzen zwei zellumhüllende Membranen, die zueinander deutliche Unterschiede sowohl in der Zusammensetzung als auch in der Funktion aufweisen. Die innere Membran besteht aus symmetrisch verteilten Phospholipiden und enthält in erster Linie Enzyme des Energiestoffwechsels und Transportproteine. Die äußere Membran weist neben einer asymmetrischen Verteilung von Phospholipiden Lipopolysaccharide auf ihrer extrazellulären Seite auf, besitzt Rezeptorproteine für die Kommunikation mit der Außenwelt, aktive und passive Transporter zur Durchleitung von Nahrungs- und Abfallstoffen, sowie Bestandteile von Proteinexkretionskomplexen. Etwa 50% der Masse der äußeren Membran besteht aus Proteinen. Um die äußere Membran räumlich zu befestigen, wird sie über spezielle Proteine (z.B. Braun'sches Lipoprotein) an die Peptidoglykan-Schicht fixiert, die zwischen der inneren und der äußeren Membran liegt.

Die äußere Membran von Gram-negativen Zellen wirkt als molekulares Sieb,¹ das externe, zellschädigende Substanzen von der Diffusion in das Zellinnere abhalten kann. So sind nur etwa 5% von neuentwickelten Antibiotika auch gegen Gram-negative Zellen wirksam – die restlichen 95% wirken nur gegen Gram-positive Bakterien, die keine äußere Membran besitzen.²

Allen Proteinen der äußeren Membran ist eine Eigenschaft gemeinsam: der membrandurchspannende Bereich hat die Struktur eines sogenannten β -Barrels. Die Proteine der inneren Membran weisen als charakteristische Struktur ausschließlich α -Helices auf. Das β -Barrel ist eine anti-parallele Anordnung von β -Strängen, die ein in sich geschlossenes β -Faltblatt in Form eines Zylinders bilden, der in seiner Länge die Membran durchspannt. Die β -Stränge sind zur Membranebene gekippt und bilden zu ihr einen Winkel, der durch den sogenannten „*shear factor*“ S ausgedrückt wird. Je größer S ist, desto weniger gekippt laufen die einzelnen β -Stränge im Verhältnis zur Membranebene.

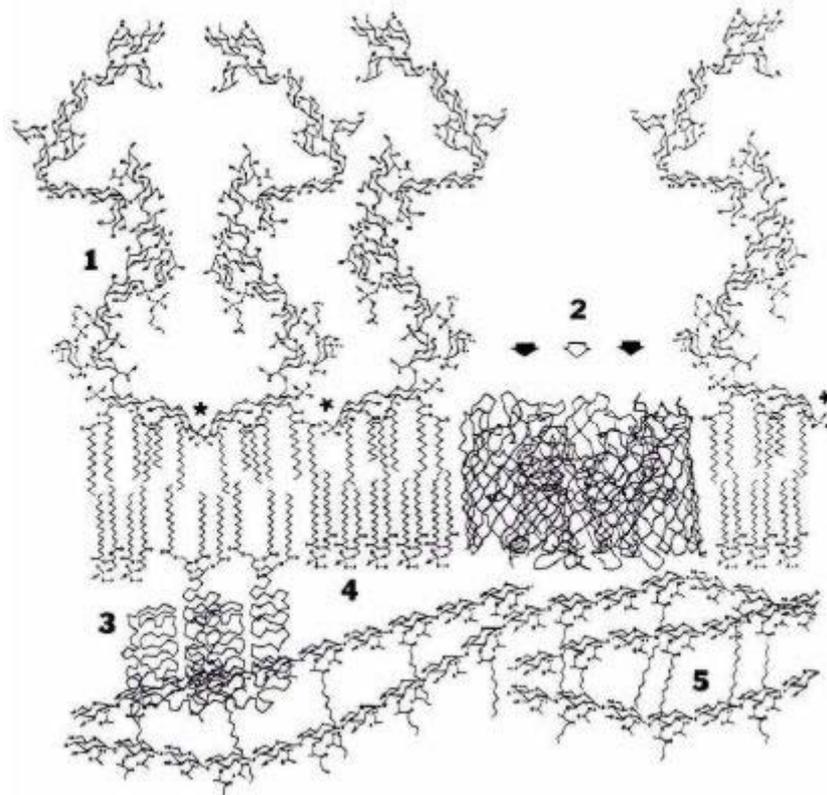


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau der äußeren Membran von *Escherichia coli*
 (1) Lipopolysaccharid (2) Porintrimer (OmpF) (3) Brownsches Lipoprotein (4) Phospholipide (5) Peptidoglykan
 (★) Bindungsstellen für zweiwertige Kationen.³

An den Kontaktflächen zur äußeren Membran liegen stark hydrophobe Aminosäurereste, die mit den Fettsäureresten der Lipide in Wechselwirkung treten und so die Lokalisation des Proteins in der Membran stabilisieren. Durch die Aneinanderlagerung der β -Stränge werden alle amidischen Protonen abwechselnd zu Donoren und Akzeptoren und können sich so gegenseitig absättigen.⁴ Um ein β -Barrel-Protein in korrekter Faltung in die äußere Membran zu inkorporieren, müssen etwa 100 Aminosäuren kooperativ gefaltet werden. Dies steht im Gegensatz zur einfachen Inkorporation von α -helikalen Proteinen, deren hydrophoben Helices nacheinander eingebaut werden können und somit nur etwa 20 Aminosäuren zugleich eine kooperative Faltung einnehmen müssen. Die korrekte Faltung von Proteinen der äußeren Membran ist deswegen häufig aufwändiger als die korrekte Produktion von Proteinen der inneren Membran.

Obwohl die Anzahl der verwendeten β -Stränge variiert, ist die Gesamtheit der β -Barrel-Proteine in ihrem Konstruktionschema von auffälliger Homogenität. Diese können in zwei große Klassen unterteilt werden: die der wasserlöslichen und die der membranständigen Proteine. Die Anzahl der β -Stränge der wasserlöslichen Proteine variiert dabei zwischen eins

und acht. Einige wichtige Vertreter sind die Metalloproteasen⁵ (ein β -Strang), Chymotrypsin⁶ (sechs β -Stränge) und Streptavidin⁷ (acht β -Stränge). Die Struktur dieser Proteine konnte aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit wesentlich früher gelöst werden als die membranständige β -Proteine, da sie sowohl in größerer Menge bereitgestellt werden können, als auch eine größere Tendenz zur Kristallisation aufweisen.

Erst die Erkenntnis, dass membranständige β -Proteine aufgrund ihrer rigiden Struktur aus denaturierten Proteinlösungen in korrekter Faltung und Anordnung gewonnen werden können, ermöglichte den Zugang zu einer Vielzahl von membranständigen β -Barrel-Proteinen.⁸ Die molekularbiologischen Methoden können somit eine langwierige und häufig sehr aufwändige Aufarbeitung ersetzen und quasi-natives Material in hoher Qualität zur Verfügung stellen. Mittlerweile sind eine Reihe membranständiger β -Proteine bekannt, die in verschiedene Unterklassen mit charakteristischen Funktionen eingeordnet werden. Neuentdeckte Proteine der äußeren Membran können rasch und mit hoher Verlässlichkeit anhand der Anzahl ihrer β -Stränge in eine der folgenden Gruppen klassifiziert werden:

- Proteine mit 8 β -Strängen: Dies ist offenbar die minimale Anzahl von β -Strängen, die ein in sich geschlossenes β -Faltblatt in Form eines β -Barrels bilden können. Diese Familie weist eine Vielzahl von Proteinen auf, die hier aufgrund ihrer Sequenzhomologien eingeordnet werden.⁹ Prominente Vertreter sind OmpA und OmpX aus *E. coli*. Eine übergreifende Funktion dieser Gruppe ist noch nicht gesichert, es hat allerdings den Anschein, dass ihre Mitglieder Funktionen in mechanischen Kontakten besitzen, sei es zur Verteidigung vor dem Angriff extrazellulärer Proteine¹⁰ (OmpX) oder als Verbindungsglied zur Peptidoglykan-Schicht^{11,12,13} (OmpA). Aufgrund der sehr engen Konstruktion dieser Proteine, wobei OmpX aufgrund eines höheren „*shear factors*“ einen etwas größeren Durchmesser als OmpA besitzt, weisen die Mitglieder dieser Klasse höchstens einen sehr kleinen Kanal durch das Proteininnere auf, teilweise nur eine Art undurchgängige Vertiefung. Dieser Befund konnte in Leitfähigkeitsexperimenten nachgewiesen werden.¹⁴
- Proteine mit 10/12 β -Strängen: Zu dieser Kategorie zählen einige Enzyme der äußeren Membran. Prominente Vertreter sind die Protease OmpT¹⁵ und die Phospholipase OmpLA.¹⁶ OmpT gehört zu den Pathogenitätsfaktoren von Bakterien. Es ist als Monomer aktiv, dessen katalytisches Zentrum auf der extrazellulären Seite des Proteins lokalisiert ist. OmpLA benötigt für eine Aktivierung der enzymatischen Aktivität allerdings eine Dimerisierung. Jede der Untereinheiten besitzt zwei

unterschiedliche Hälften der beiden enzymatischen Zentren und erst durch die korrekte Aneinanderlagerung entsteht die Ausbildung der Aktivität. Es besitzt keinen durchgängigen Kanal. OmpLA spielt eine Rolle in der Sekretion von Virulenzfaktoren. Indirekt zu dieser Gruppe gehört TolC.¹⁷ Dieses Protein formt aus drei identischen Untereinheiten mit je vier antiparallelen β -Strängen einen einzelnen Kanal, der als β -Barrel konstruiert ist. TolC hat eine sehr hohe konformelle Mobilität und ist für den Export von kleineren löslichen Molekülen, aber auch Proteinen verantwortlich.

- Proteine mit 16 β -Strängen: Zu dieser Kategorie zählen die passiven unspezifischen Porenproteine der äußeren Membranen. Prominente Vertreter sind das Porin^{18,19} aus *Rhodobacter capsulatus* und OmpF^{20,21} aus *Escherichia coli*. Das Porin aus *Rhodobacter capsulatus* war das erste β -Protein, dessen atomare Struktur gelöst werden konnte.¹⁹ OmpF ist das am besten untersuchte Porin, für das Untersuchungen zu den Bereichen Porendurchmesser, Selektivität, physikalische Messungen und Auswirkungen spezifischer Mutationen durchgeführt worden sind. In diese Kategorie fällt ebenfalls das in der vorliegenden Arbeit betrachtete Porin Omp32 aus *Delftia acidovorans*. Die Aufgabe dieser Porine besteht im passiven Transport von kleinen löslichen Molekülen, die im Allgemeinen nicht größer als 600 Da sind. Teilweise besitzen diese Proteine sehr unspezifische Bindungsstellen für unterschiedlichste Substanzen,¹⁹ die die Aufnahme dieser Moleküle erleichtern sollen. Alle Porine liegen im nativen Zustand als Trimere vor, wobei jede Untereinheit einen eigenen Kanal bildet. Aufgrund des großflächigen Kontaktes und den teilweise stark hydrophilen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Untereinheiten sind diese Trimere sehr stabil.

- Proteine mit 18 β -Strängen: Zu dieser Kategorie zählen die passiven spezifischen Kanäle der äußeren Membran. Es sind nur wenige Mitglieder bekannt, darunter das Maltoseporin LamB^{22,23} sowie das Sucroseporin ScrY.^{24,25} Diese Porine besitzen einen stark deformierten inneren Kanal, der für die spezifische Aufnahme des Substrates optimiert ist. Interessanterweise können die beiden Porine durch den Austausch von wenigen Aminosäuren hinsichtlich ihrer Spezifität ineinander überführt werden.²⁶ Die Funktionsweise dieser Porine wurde durch Mutagenese,²⁷ aber auch über energetische Betrachtungen zum Transport der Substrate *in silico*^{28,29} untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Substrate auf einer Art „Rutsche“, der sogenannten „greasy slide“ innerhalb der Porins weitergereicht werden und dabei mehrere diskrete Bindungsstellen existieren, die zugleich die Spezifität herstellen.
- Proteine mit 22 β -Strängen: Zu dieser Gruppe zählen die Eisen-Transporterproteine FhuA,³⁰ FepA³¹ und FecA.³² Sie sind aktive Transporter, die unter ATP-Verbrauch komplexiertes Eisen vom Exoplasma ins Periplasma schleusen. Da den Proteinen im Periplasma kein ATP zur Verfügung steht, wird die Energetisierung von Proteinen bewerkstelligt, die sich in der Cytoplasmamembran befinden und mit den Fe-Transportern in Kontakt stehen.^{33,34} Ein großer Loop im Inneren des β -Barrels blockiert dabei die Abgabe des an die Transporter gebundenen komplexierten Eisens ins Periplasma. Durch die Interaktion mit dem TonB-Apparat der inneren Membran als aktivierter Energiespender wird diese Barriere konformell verschoben und das Eisen ins Periplasma entlassen.

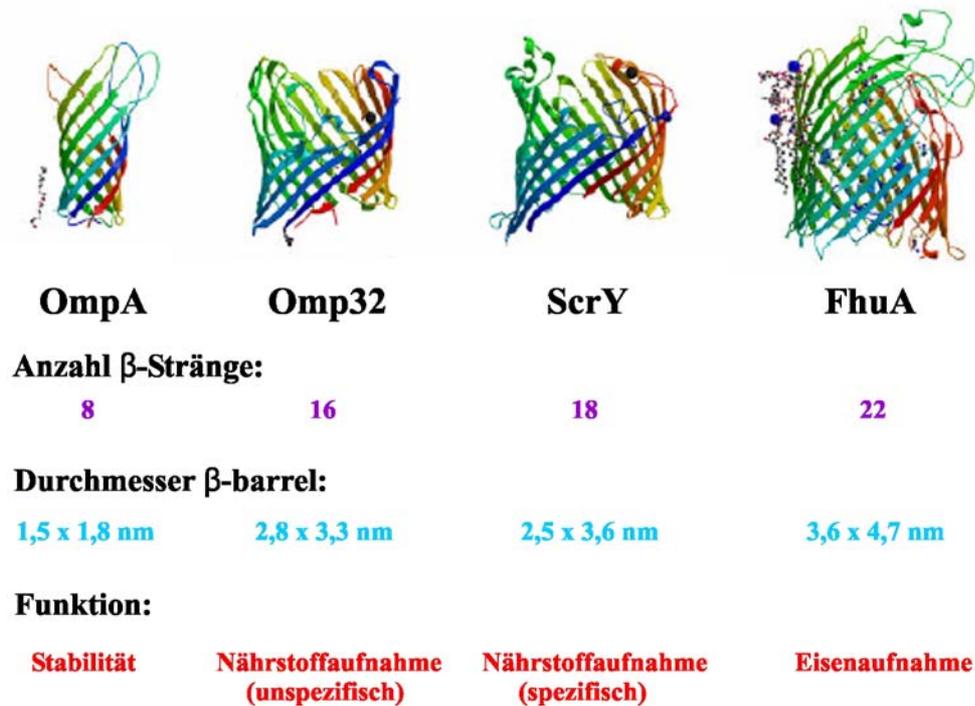


Abbildung 3.2: *Porinklassen von Gram-negativen Bakterien*

Dargestellt ist je ein Vertreter der vorherrschenden Klassen von Porinen aus Gram-negativen Bakterien, sowie eine Auflistung der Strukturelemente und Daten. Die Unterscheidung der Klassen erfolgt anhand der Anzahl der jeweiligen β -Stränge. Beginnend am N-Terminus sind die einzelnen Stränge von blau nach rot eingefärbt. Der angegebene Durchmesser der Porine bezieht sich auf die minimalen Distanzen zweier gegenüberliegender C_{α} -Atome des porenbildenden Barrels. In der untersten Zeile wurden Angaben zu den Funktionen der einzelnen Proteine aufgeführt.⁴⁹

3.2 Omp32 – ein Porin mit außergewöhnlichen Eigenschaften

Omp32 zählt mit seinen 16 β -Strängen zur Gruppe der unspezifischen Porine. Es ist das Hauptprotein der äußeren Membran³⁵ des Gram-negativen β -Proteobakteriums *Delftia acidovorans*, das in älteren Publikationen als *Comamonas acidovorans* bezeichnet wird.³⁶ Dieses Bakterium ist weit verbreitet in Süßwasser- und Bodenhabitaten. Ihm wird zusätzlich eine gewisse medizinische Relevanz zugeschrieben, da es als opportunistischer Hospitalismuskeim Sekundärinfektionen hervorrufen kann.³⁷ Wie der Name bereits andeutet, sind die bevorzugten Kohlenstoffquellen des Organismus niedermolekulare organische Säuren, wie beispielsweise Äpfelsäure.³⁸ Omp32 besitzt eine Masse von 34,8 kDa und besteht aus 332 Aminosäuren. Als membranständiges Protein weist es von seiner primären Proteinsequenz her 19 zusätzliche Aminosäuren auf, die das N-terminale Leaderpeptid des Proteins bilden.³⁹ Während seiner Translation wird es durch die innere Membran transportiert, wobei dieses Leaderpeptid abgeschnitten wird. Das fertig gereifte Porin assembliert wahrscheinlich selbstständig in seine endgültige trimere Form. In diesem funktionellem Zustand weist es einige außergewöhnliche Eigenschaften auf, die es aus der Gruppe der unspezifischen Porine herausragen lassen:

- Omp32 besitzt die größte Selektivität mit etwa 20:1 bezüglich Anionen zu Kationen, die in einem passiven Transportporin bisher gefunden wurden.⁴⁰
- Die Ladungen innerhalb der Pore werden nicht durch gegenüberliegende Ladungen wie in OmpF kompensiert.^{41,42}
- Mit einer minimalen Querschnittsfläche von 25 Å² besitzt Omp32 den engsten Porendurchmesser von allen bekannten unspezifischen Porinen.

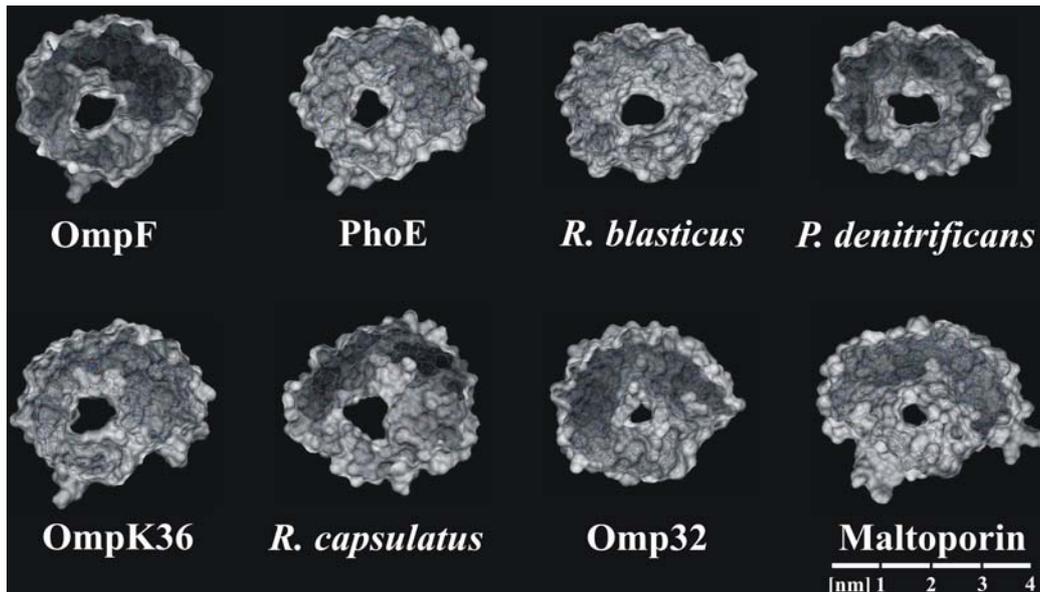


Abbildung 3.3: Darstellung der Porendurchmesser von bekannten Porinen

Omp32 hat von allen bekannten unspezifischen Porinen den geringsten Porendurchmesser. Nur das ebenfalls dargestellte spezifische Porin Maltoporin weist einen vergleichbaren Querschnitt im Kanalinneren auf. Eine zumindest partielle Spezifität für Omp32 kann somit wahrscheinlich ebenfalls formuliert werden.

Wie bei allen anderen unspezifischen Porinen weist auch Omp32 einen Schließmechanismus auf, der bei Anlegen einer transmembranen Spannung ausgelöst wird. In Omp32 tritt diese Erscheinung bereits ab etwa 10-30 mV ein, ein wesentlich niedrigerer Wert als für die übrigen unspezifischen Porine. Dieser Prozess wird allgemein als „*voltage gating*“, treffender als „spannungsabhängiges Schließen“ bezeichnet. Der Mechanismus ist noch immer ungeklärt und insbesondere seine Funktion *in vivo* ist umstritten.^{43,44,45} Eine Interpretation ist, dass dieser Effekt durch eine Kollabierung der Pore zustande kommt.^{46,47} *In vivo* auftretende Spannungen über die äußere Membran gehen auf das Donnangleichgewicht zurück und erreichen normalerweise nicht die für diesen Effekt notwendigen Spannungswerte von etwa 30 mV.⁴⁸ Das „*voltage gating*“ wurde deswegen ausschließlich unter Laborbedingungen beobachtet und es ist fraglich, ob ihm eine tatsächliche physiologische Bedeutung zugeschrieben werden kann. Es ist aber dennoch von großem Interesse, den dahinterliegenden Prozess studieren zu können.

Durch den geringen Porenquerschnitt und den mit vielen Ladungen ausgestatteten Porenkanal ist zu erwarten, dass bei Omp32 die Wechselwirkung zwischen Aminosäuren und den passierenden Ionen besonders ausgeprägt ist. Dafür sprechen auch Eigenschaften von Omp32, die bei anderen Porinen nicht festgestellt werden konnten. Strom-Spannungskurven anderer Porine zeigen einen linearen Verlauf – der durchfließende Strom reagiert in beiden Richtungen proportional auf die angelegte Spannung. Omp32 weicht von dieser Linearität ab,

wobei der Effekt um so besser beobachtet werden kann, je niedriger die Ionenstärke der angelegten KCl-Lösung ist.⁴⁰

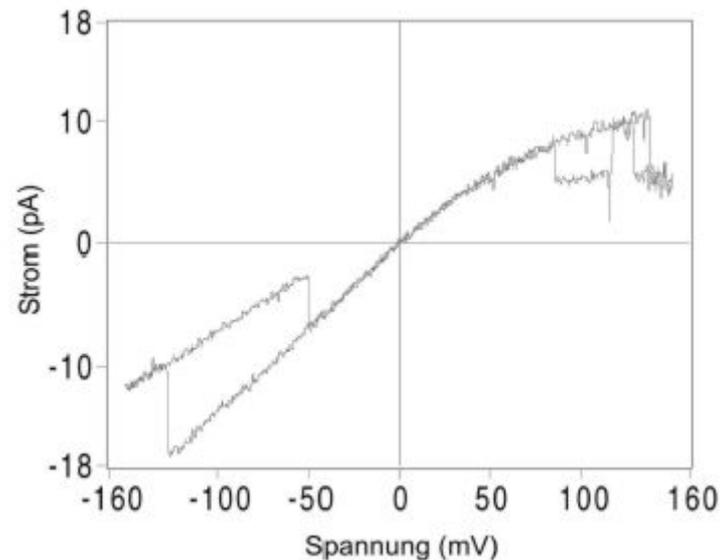


Abbildung 3.4: *I-U-Charakteristik von Omp32*

Nach Einbau in eine planare „Blacklipid Membran“ ist die Asymmetrie und Nichtlinearität der gemessenen Kurve gut erkennbar. Schließereignisse treten bei -50 und -130 mV auf; Öffnungseignisse bei $+80$ und $+120$ mV und sind durch die Stufen innerhalb der Grafik gekennzeichnet. Messung bei 10 mM KCl-Lösung.⁴⁰

Zu den außergewöhnlichen Ergebnissen dieser Messungen zählen ebenfalls eine starke Asymmetrie bezüglich der Polarität der angelegten Spannung, sowie eine Nichtlinearität der Leitfähigkeit im Verhältnis zur angebotenen Elektrolytkonzentration. Es wird angenommen, dass diese Beobachtungen auf die Interaktionen der einzelnen Ionen mit dem Porinkanal zurückzuführen sind. Wie bereits erwähnt, ist der Kanal außerordentlich eng, sodass nur einzelne Ionen passieren können.⁵¹ Dadurch wird die freie Diffusion praktisch unmöglich gemacht und ist auf die maximale Durchgangsgeschwindigkeit pro Molekül durch den Porin-Kanal beschränkt. Insbesondere für größere Anionen wie deprotonierte Karbonsäuren, beispielsweise Malat, wird die Passage durch das Porin stark verlangsamt. Durch den engen Kontakt kann aber die durch Ladungen vermittelte Selektivität effizient ausgenutzt werden. Diese Selektivität für Anionen im Allgemeinen und Karbonsäuren im Speziellen ist notwendig für ein Bakterium, dessen primäre Nahrungsquelle organische Säuren darstellen.

Die Kristallstruktur von Omp32 wurde mit einer atomaren Auflösung von $2,1 \text{ \AA}$ bestimmt.⁴⁹ Zachariae nahm auf der Basis dieses Modells Molekuldynamik-Rechnungen vor, die Informationen zum Selektivitätsmechanismus von Omp32 lieferten.⁵⁰ Die strukturelle Grundlage bilden fünf Aminosäuren, die mittlerweile als der „Arginin-Cluster“ bekannt

sind.⁵¹ Es handelt sich dabei um drei Arginine (R38, R75, R133), sowie zwei Glutamate (E58, E60). Die Arginine sind so angeordnet, dass ihre Seitenketten mit hoher Beweglichkeit in das Lumen des Kanals ragen können. Die Glutamate sind im Inneren der Barrel-Wand lokalisiert und liegen sterisch gesehen sehr dicht „hinter“ den Argininen. Durch diese kompakte Konstruktion werden folgende Wirkungen erzielt:

- Die durch die räumliche Nähe der Arginine untereinander entstehende elektrostatische Abstoßung wird unterbunden. Ohne Stabilisierung durch die Glutamate wäre eine maximale Ladung von +2 zu erwarten,⁵¹ die delokalisiert über die drei Aminosäureseitenketten bei physiologischem pH vorliegen sollte. Die Salzbrücken stabilisieren die Ladungen der Argininreste, die bei pH7 eine vollständige Ladung von +3 im Kanalbereich aufweisen.⁵¹
- Durch die besondere Anordnung des Arginin-Clusters im Inneren des Proteins entsteht in Omp32 kein transversales Feld wie in OmpF. Die positiven Ladungen der drei relevanten Arginine werden durch die dahinterliegenden geladenen Glutamate bei physiologischem pH vollständig stabilisiert. Gleichzeitig werden die negativen Ladungen abgeschirmt und reichen nicht in den Kanal von Omp32 hinein. Die positiven Ladungen der Arginine erzeugen damit das elektrostatische Feld von Omp32. Es reicht aus der Pore hinaus und vermittelt die beobachtete Anionselektivität des Porins. Dieser Mechanismus ist die hauptsächliche Ursache des Selektivitätsfilters von Omp32.
- Die Konstruktion des Kanalinneren erlaubt einigen wenigen Aminosäureseitenketten eine hohe Flexibilität. Es konnte mittels Moleküldynamik der Weg einzelner Anionen bei der Passage durch das Porin simuliert werden.⁵² Dabei zeigt sich, dass vor allem die drei Arginine des Clusters eine tragende Rolle im Transport von Substraten besitzen.
- Es wird angenommen, dass die Aminosäuren des Arginin-Clusters nicht nur für Selektivität und den eigentlichen Transport der anionischen Substrate durch das Porin verantwortlich sind, sondern zusätzlich am Aufbau einer diskreten Bindungsstelle für organische Säuren beteiligt sind. In den Kristalldaten von Omp32 ist ein SO_4^{2-} -Anion innerhalb des Lumens identifizierbar.⁴⁹ Es wird angenommen, dass dies die bevorzugte Tasche für ein Andocken von Substraten *in vivo* darstellt. Diese ist in unmittelbarer Nähe des Arginin-Clusters zu finden.

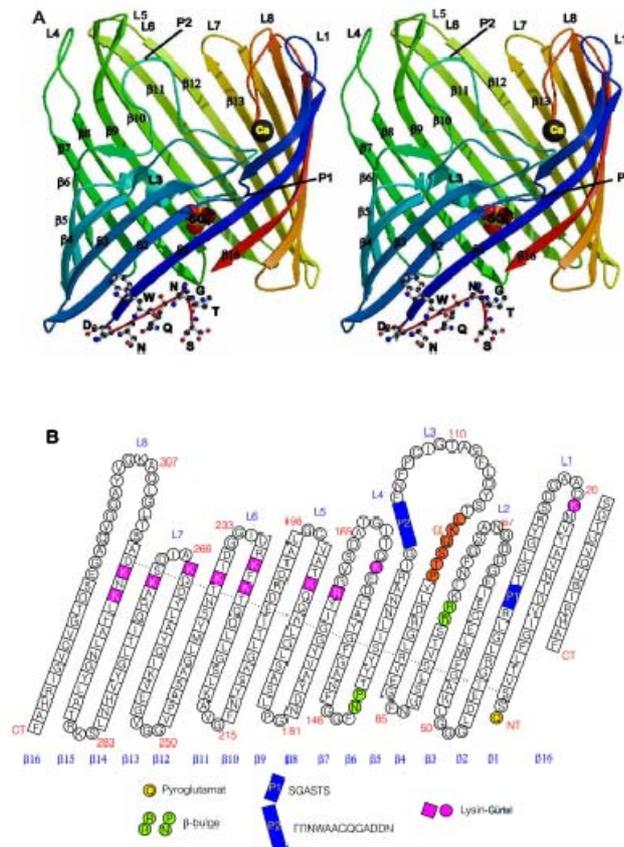


Abbildung 3.5: Darstellung von Omp32

(A) Stereobild von Omp32. Am unteren, periplasmatischen Rand des Monomers sind acht Aminosäuren dargestellt, die nicht Omp32, sondern dem Porin-assoziierten Protein zuzurechnen sind [3.3.] Die Farbgebung beginnt mit dem blau markierten β -Strang des N-Terminus. β -Stränge sind mit $\beta 1$ - $\beta 16$, extrazelluläre Loops mit L1-L8 nummeriert. P1 ist eine Ausstülpung von $\beta 2$, die in das Innere des Kanals zeigt. P2 wird von $\beta 3$ geformt, die zur extrazellulären Seite von Omp32 gerichtet ist. Innerhalb des Kanals wurde in der Kristallstruktur ein Sulfat-Ion (SO_4^{2-}) identifiziert. (B) Faltungsmodell und Aminosäuresequenz von Omp32.⁴⁹

Für OmpF wurden Berechnungen unternommen, in denen auf der Grundlage der gelösten Kristallstruktur das Verhalten des Porins sowie der Einfluss von funktionellen Aminosäuren nachgewiesen wurde.⁴⁴ Der Nachweis erfolgte über molekularbiologische Methoden, in denen die relevanten Aminosäuren mutiert wurden, um so ihren tatsächlichen Einfluss auf das Verhalten von OmpF zu überprüfen.⁵³ Die theoretischen Untersuchungen an Omp32 wiesen *in silico* die Bedeutung des Arginin-Clusters für dessen charakteristischen Eigenschaften wie die hohe Selektivität bei geringer Spezifität nach. Da die Eigenschaften von Omp32 die theoretischen Untersuchungen und die daraus möglichen Aussagen besonders wertvoll machen, müssen auch im Fall von Omp32 die erhobenen Daten durch praktische Experimente untermauert werden.

3.3 Porin-assoziiertes Protein (PAP)

In fast allen Bakterien existieren mehrere Arten von Proteinen, die einen direkten Kontakt zur Peptidoglykan-Schicht der Zellwand vermitteln und so mitverantwortlich für die übergreifende Verankerung der inneren Membran, des Peptidoglykans und der äußeren Membran sind.⁵⁴ Zu diesen Proteinen gehören das Murein-Lipoprotein⁵⁵ sowie das Peptidoglykan-assoziierte Lipoprotein (PAL).⁵⁶ Ein weiteres Beispiel ist OmpA, von dem angenommen wird, dass dessen vorrangige Aufgabe die Verbindung zwischen äußerer Membran und Peptidoglykan darstellt.⁵⁷ Es existieren mehrere Proteine mit identischer Funktion, die ebenfalls die OmpA-Faltung aus einem acht-strängigen β -Barrel, einem kurzen Linker und einer C-terminalen Bindedomäne für Peptidoglykan besitzen.⁵⁸

Neben diesen drei Gruppen existiert zumindest eine weitere Klasse von Proteinen in Gram-negativen Bakterien, die eine Bindedomäne für Peptidoglykan aufweisen: die Porin-assoziierten Proteine (PAP). Aus dieser Klasse sind bisher nur wenige Beispiele bekannt, darunter das Protein PIII von *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁹ sowie das PAP aus *Rhodospirillum rubrum* FR1.⁶⁰ Diese Proteine binden nicht wie die Mitglieder der OmpA-Klasse über eine direkte Verbindung zwischen äußerer Membran und Peptidoglykan-Schicht, sondern nur indirekt. Diese wird über eine starke nicht-kovalente Bindung mit dem Peptidoglykan und eine starke nicht-kovalente Bindung an Porine der äußeren Membran geschlossen. Die Proteine der PAP-Klasse agieren dabei als Verbindungsstück zwischen den jeweils gebundenen membranständigen Porinen und dem Peptidoglykan der Zellwand. Diese Verbindungen sind in *Rhodospirillum rubrum* FR1 gegenüber denaturierenden Bedingungen sehr resistent.⁶¹ Unter solchen Bedingungen zerfällt der native Komplex aus Porin und PAP und ergibt für PAP eine zusätzliche Bande bei 32 kDa.

Diesen Proteinen gemeinsam ist ein stark homologer 100-140 Aminosäure langer C-terminaler Abschnitt, der wahrscheinlich an das Peptidoglykan bindet.^{54,62} Über eingebundene Porine und die daran angelagerten PAP-Moleküle wird die äußere Membran somit indirekt an die Zellwand fixiert. Dabei beeinflusst PAP scheinbar nicht die Selektivität und Spezifität des jeweils gebundenen Porins als passiver Transporter.⁶³

Die Entdeckung von PAP bei *Delftia acidovorans* geht auf einen Zufall zurück. In der Kristallstruktur von Omp32 war eine Massendichte an der periplasmatischen Seite des Porins festgestellt worden, die nicht zum Porin gehörte und acht Aminosäuren eines anderen Polypeptides darstellen. Dabei wies jedes Omp32-Trimer drei dieser Massedichten auf. Die

Aufreinigung von Omp32 gab jedoch bis zu diesem Zeitpunkt keinen Hinweis auf ein zusätzliches Protein, da Omp32 in diesen Lösungen scheinbar rein vorlag. Erst genauere Untersuchungen ergaben, dass ein weiteres Polypeptid neben Omp32 vorlag – welches mit einem Molekulargewicht von etwa 6 kDa in allen vorherigen Untersuchungen der Beobachtung entgangen war. Eine Abtrennung von PAP von Omp32 war ebenfalls nur durch starke Hitzeeinwirkung vor einer SDS-PAGE zu bewirken. Eine anschließende Sequenzierung des Proteins gelang über Edman-Abbau, somit konnte die Primärsequenz auf Proteinebene bestimmt werden.⁶⁴ Diese besteht aus nur 51 Aminosäuren, die zur damaligen Zeit eine auffallende Homologie zu bekannten Proteinen mit einem wesentlich höheren Molekulargewicht von etwa 20 kDa aus der Gruppe der *Bordetella* und *Neisserien* aufweisen. Sehr früh entstanden so die ersten Überlegungen, dass PAP aus *Delftia acidovorans* wahrscheinlich ein verkürzte Form der gefundenen Homologa darstellt. Zugleich konnte aber ohne DNA-Informationen eine Veränderung von PAP in *Delftia acidovorans* nicht ausgeschlossen werden. Dieses Problem kann nur durch die Aufklärung der entsprechenden DNA-Sequenz beantwortet werden.

Um Zugang zur Sequenz von *pap* zu erhalten, wird das Gen aus dem Genom von *D. acidovorans* in einen Klonierungsvektor überführt werden, um anschließend die Sequenzierungsreaktionen durchführen zu können. Falls das Gen nicht in seiner Gesamtheit isoliert werden kann, muss die DNA-Information in mehreren Abschnitten so gelöst werden, dass die gewonnen Daten einander überlappen, um so die Fortführung des Leserahmens gewährleisten zu können. Die Rekonstruktion der genomischen Information arbeitet sich dabei stückweise vorwärts, und benutzt als Abgleich die gelösten Sequenzen von homologen Proteinen wie PAP aus *Ralstonia solanaceae*,⁶⁵ bzw. RmpM aus *Neisseria meningitidis*.⁶⁶ Die so fertiggestellte Information zu *pap* kann anschließend weiter untersucht werden. Dies betrifft insbesondere erste Informationen über die Primärstruktur des Proteins, sowie mögliche Lösungsansätze des Faltungsmusters von PAP und daraus resultierende Schlussfolgerungen zur Funktion des Proteins.

4 Materialien und Methoden

4.1 Molekularbiologie, allgemein

4.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme unterscheiden sich in zwei charakteristischen Hauptpunkten: Klonierungsstämme mit den Fähigkeiten, effizient DNA aufzunehmen, in hoher Menge Plasmide anzureichern und diese aufgrund mehrerer fehlender DNA-Reparaturmechanismen in hoher Qualität zu produzieren; sowie Produktionsstämme, die auf hohe Genexpression optimiert sind.

Tabelle 4.1: Verwendete Bakterienstämme und deren Eigenschaften

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp und relevanter Phänotyp	Bemerkungen
BL21 (DE3)	<i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>ompT lon F⁻ dcm gal</i> λ (DE3) ⁶⁷	Chromosomale Kopie der T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des lac _{uv5} - Promotors, defizient in der ompT-Protease und der Lon-Protease
BL21 (DE3)	<i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>ompT lon F⁻ dcm gal</i> λ (DE3) <i>pLysS</i> ⁶⁸	defizient in der ompT-Protease und der Ion-Protease, stringente Basalrepression durch T7 Lysozym, Chloramphenicol-Resistenz
BL21 (DE3)	<i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>ompT lon F⁻ dcm gal</i> λ (DE3) <i>pLysE</i> ⁶⁸	defizient in der ompT-Protease und der Ion-Protease, extrem stringente Basalrepression durch T7 Lysozym, Chloramphenicol-Resistenz
BL21 (DE3) Rosetta	<i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>ompT lon, F⁻, lacY dcm gal, \lambda(DE3) <i>pRARE</i>⁶⁸</i>	Verbesserung der Expression durch erhöhte Bereitstellung/ Verwendung von seltenen tRNA's. Primärer Expressionsstamm
XL1 Blue	<i>supE44 hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁺), <i>recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac⁻ F['] [proAB⁺ lacI^f ZAM15, ::Tn10(Tet^r)]</i> ⁶⁷	rekombinationsdefizienter Stamm mit hoher Transformationseffizienz. Primärer Klonierungsstamm
JM109	<i>supE44 hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁺) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 \O(<i>lac-proAB</i>) [<i>F</i>['], <i>traD36, proAB lacI^f ZAM15]</i>⁶⁷</i>	rekombinationsdefizienter Stamm mit hoher Transformationseffizienz. Empfohlener Stamm für Mutagenese mit pALTER [4.2.2.]
ES1301	<i>lacZ53 mutS201::Tn5 thyA36 rha-5 muts metB1 deoC IN(rrnD-rrnE)</i> ⁶⁷	Reparaturdefizienter Stamm von DNA-Fehlpaarungen, Mutationsstamm für Mutagenese mit pALTER [4.2.2.]

Die Plasmide pLysS und pLysE enthalten das Gen für eine basale Produktion von T7-Lysozym. Dies unterdrückt im basalen Zustand die Expression der Gene, deren Transkription primär durch T7 RNA Polymerase durchgeführt wird und somit die experimentell relevanten Proteine.⁶⁹ Durch die Zugabe von IPTG steigt die Expression an, erreicht dabei aber nicht das Niveau von nicht-reprimierten Zelllinien wie BL21(DE3). Zur Klonierung wurde beinahe ausschließlich der Stamm XL1 Blue verwendet, der reproduzierbar DNA in hervorragender Qualität ergab. Die Stämme JM109 und ES1301 *mutS* wurden nur für die Mutationsmethode der Firma Promega [4.2.2] verwendet.

4.1.2 Verwendete Plasmide

Für aufwändige Klonierungen, insbesondere nach PCR-Reaktionen von genomischer DNA, wurden hauptsächlich die Plasmide pUC18 und pBAD-TOPO[®] (Invitrogen) verwendet. Beide Vektoren ergaben gute bis sehr gute Ligations- und Transformationsraten. Im Fall von pBAD-TOPO erleichterte eine Aktivierung des offenen Vektors über die kovalente Bindung von je einer Topoisomerase am 3'-Ende eines DNA-Einzelstranges die Ligationen. Der Vektor pALTER-EX1 ist ein Hybrid aus Klonierungs- und Expressionsvektor. Er wurde – bis auf wenige Ausnahmen bei Klonierungsexperimenten zur Isolation von PAP – nur in Verbindungen mit dem Mutationskit der Firma Promega verwendet. Der Vektor pET17b ist ein Expressionsvektor, der über die auf ihm codierte Ampicillin-Resistenz selektiert werden. In die „multiple cloning site“ wurde über einen NdeI/EcoRI Verdau *omp32* einligiert. Der enthaltene T7 Promotor regulierte später in Expressionsexperimenten die Produktion des heterologen Proteins.

4.1.3 Isolation von genomischer DNA aus *D. acidovorans*

100 ml einer Übernacht-Kultur von *D. acidovorans* wurden für 10 min bei 6.000 g abzentrifugiert und mit 200 ml TEN-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 3,5 ml Puffer B1 resuspendiert. Nach Zugabe von 8 mg Lysozym und 100 µl ProteinaseK-Lösung wurde die Suspension für 1 h bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 1,2 ml Puffer B2 wurden Nukleasen und DNA-bindende Proteine für 30 min bei 50°C vollständig denaturiert. Auf eine mit 4 ml Puffer QBT prä-equilibrierte DNA-Bindesäule wurde die kräftig durchmischte genomische DNA-Lösung aufgetragen. Bei zu geringem Fluss konnte Druck auf die Säule über den Stempel einer Spritze ausgeübt werden. Die Säule wurde anschließend zwei mal mit jeweils 7,5 ml Puffer QC gewaschen. Zur Elution der genomischen DNA wurden 5 ml eines auf 50°C erwärmten Puffers QF verwendet. Zur Präzipitation der DNA wurden 3,5 ml

eiskaltes Isopropanol zugegeben, sanft geschüttelt und 20 min bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14.000 g für 15 min bei 4°C wurde der Überstand vollständig abgenommen und das DNA-Pellet mit 2 ml eiskalten 70% EtOH vorsichtig gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die DNA für 10 min im offenen Reaktionsgefäß getrocknet. Um das Pellet zu lösen, wurden 1 ml TE-Puffer zupipettiert und der Ansatz über Nacht bei 55°C sanft geschüttelt. Eine abschließende $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Messung gab Aufschluss über den Reinheitsgrad der DNA.

4.1.4 Isolation von plasmidischer DNA

Um eine Sequenzierung der mutierten Plasmide und deren Transformation in den Expressionsstamm durchführen zu können, musste die Plasmid-DNA in sehr reiner Form und in salzfreier Lösung isoliert werden. Die angewendete Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen und anschließender Adsorption der DNA an Kieselgel in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen.⁷⁰

Eine Übernachtskultur von 3 ml der frisch transformierten Zellen wurde 10 Minuten bei 4°C und 14.000 g abzentrifugiert, das Pellet gemäß dem QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol in RNase-haltigem Puffer resuspendiert und mit SDS-haltigem Puffer lysiert. Anschließend wurden die Proteine ausgefällt und abzentrifugiert, wobei die löslichen Nukleinsäuren im Überstand verblieben und bei hoher Salzkonzentration auf QIAprep Spin Columns aufgetragen wurden. Dies gewährleistete eine selektive Bindung der Plasmid-DNA an die Kieselgel-Membran, während die anderen Bestandteile des Lysats ausgewaschen wurden. Die Elution erfolgte mit $50\ \mu\text{L}$ 50°C warmen TE-Puffer. Auf diesem Weg wurden ca. $15\ \mu\text{g}$ des jeweiligen Plasmids erhalten.

4.1.5 Restriktionsverdau genomischer DNA

50 μl	genomische DNA, [DNA] = 10 ng/ μl (siehe [4.1.3])
10 μl	10x PufferSystem, angepasst an das jeweilige Restriktionsenzym
1 μl	100x BSA
2 + 1 μl	Restriktionsenzym, siehe unten
27 μl	ddH ₂ O
100 μl	Gesamtvolumen

Die hierbei verwendeten Restriktionsenzyme (Inkubationstemperaturen) waren ApaI (25°C), BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII und SphI (alle 37°C). Die Ansätze wurden bis auf die

Restriktionsenzyme pipettiert, bei ihrer jeweiligen Inkubationstemperatur 5 min prä-inkubiert und anschließend mit 2 µl des jeweiligen Restriktionsenzym versetzt. Nach 10 min und 30 min wurde der Ansatz kurz gemischt und abzentrifugiert, um eine interne Gradientenbildung zu vermeiden. Nach 45 min wurden den Ansätzen 1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym zugesetzt, durchmischt, abzentrifugiert und für weitere 45 min inkubiert. Zur Deaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Ansätze nach den Empfehlungen des Herstellers 20 min bei entsprechender Hitze inkubiert. Die so geschnittene genomische DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.1.6 Analytischer Endonukleasenverdau von DNA

max. 100 ng	DNA, [] = variierend
1 µl	10x PufferSystem, auf maximale Gesamtaktivität ausgerichtet
0,5 µl	pro Restriktionsenzym, Kombinationen möglich
ad 10 µl	ddH ₂ O
10 µl	Gesamtvolumen

Die Ansätze wurden fertiggestellt und bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für mindestens 30 min inkubiert. Nach Beendigung des Verdau wurde jeweils 1 µl 10x DNA-Laufpuffer zugesetzt und die einzelnen Proben auf ein analytisches Gel [4.1.9] aufgetragen. Es musste bei einer Kombination von Restriktionsenzymen darauf geachtet werden, dass laut Herstellerangaben sowohl die Aktivitäten in den jeweiligen Puffersystemen, als auch die Inkubationstemperaturen untereinander kompatibel waren.

4.1.7 Quantitativer Endonukleasenverdau von DNA

500 - 6000 ng	Plasmidische oder PCR-generierte DNA, [] = variierend
10 µl	10x PufferSystem, auf maximale Gesamtaktivität ausgerichtet
1 µl	100x BSA
2 + 2 µl	EcoRI
4 + 2 µl	NdeI
ad 100 µl	ddH ₂ O
100 µl	Gesamtvolumen

Die Ansätze wurden bis auf die Restriktionsenzyme pipettiert, bei 37°C 5 min prä-inkubiert und anschließend mit 2 µl EcoRI bzw. 4 µl NdeI versetzt. Nach 10 min und 30 min wurde der

Ansatz kurz durchmischt und abzentrifugiert, um eine interne Gradientenbildung zu vermeiden. Nach 45 min wurden den Ansätzen jeweils 2 µl weiteres Restriktionsenzym zugesetzt, durchmischt, abzentrifugiert und für weitere 45 min inkubiert. Zur Deaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Ansätze nach den Empfehlungen des Herstellers 20 min bei entsprechender Hitze inkubiert. Die so geschnittenen DNA-Fragmente wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Halbwertszeit der Aktivität von NdeI ist geringer als die von EcoRI, hinzu kommt eine geringere Aktivität/µl. Um vergleichbare Enzymaktivitäten von EcoRI und NdeI zu erhalten, wurde ein größeres Volumen NdeI zugegeben. Zugleich durfte aber die Gesamtmenge an zugegebener Enzymlösung 10% des Gesamtvolumens im präparativen Fall nicht übersteigen, da ansonsten die Spezifität der Restriktionsenzyme durch eine zu hohe Glycerinkonzentration beeinträchtigt worden wäre. Sowohl Insert als auch Vektor einer Ligation mussten auf diese Art geschnitten werden, um kompatible Enden zu generieren.

4.1.8 Dephosphorylierung geschnittener plasmidischer DNA

Plasmidische DNA aus [4.1.7] wurde nach der Hitze-Inaktivierung der Restriktionsenzyme mittels CIP dephosphoryliert. Der vollständige Restriktionsansatz wurde mit 1 µl CIP versetzt, 1 h bei 37°C inkubiert, nochmals 1 µl CIP zugesetzt und für 1h bei 55°C inkubiert. CIP ist Temperatur-resistent, deswegen erfolgte eine Abtrennung sowohl von nichtgeschnittener DNA, als auch aller sonstigen Bestandteile der Ansätze über präparative Agarosegele, mit nachgeschalteter Bandenexzision und DNA-Isolation aus Agarosestücken. Es wurde ausschließlich plasmidische Träger-DNA dephosphoryliert. Dieser Schritt war ausschlaggebend für die Quantität der Kolonienanzahl und damit die Qualität einer Ligation. Er konnte durch den Einsatz von unterschiedlichen Restriktionsenzymen, bzw. bei Inkompatibilität der resultierenden aktivierten DNA-Enden entfallen, da die Wahrscheinlichkeit eines Selbstschlusses ohne Insert aufgrund der nicht zueinander passenden Enden bereits ohne enzymatische Unterstützung gering war.

4.1.9 DNA-Agarosegelelektrophorese

Je nach gewünschter Trennleistung der Gele wurde die Agaroseendkonzentration variiert. Für eine gute Trennung im Bereich von 1 kbp bis 10 kbp wurden Agarosegele der Stärke 0,8% verwendet, für den Bereich vom 0,1 kbp bis 1kbp Agarosegele der Stärke 3%.

Im präparativen Fall wurde die zusammengesetzte Agarosekammer vollständig mit 100% EtOH, danach mit ddH₂O ausgespült und an der Luft getrocknet. Das Volumen der Gelkammer wurde berechnet, anschließend eine entsprechende Menge an Agarose in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 1x TAE-Puffer auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Der Kolben wurde gewogen und das Gewicht notiert. Nach 2 min in der Mikrowelle bei maximaler Leistung wurde die Agaroselösung solange sanft bewegt, bis sich alle sichtbaren Agarosekristalle vollständig auflösten und sich eine homogene Lösung bildete. Nach einer nochmaligen Gewichtsbestimmung wurde die Massendifferenz mit ddH₂O ausgeglichen und das Gel nach Abdichten der Gelkammer zügig gegossen. Dabei entstehende Luftblasen an der Oberfläche wurden entweder zum oberen Rand geschoben, oder mithilfe eines Bunsenbrenners entfernt. Ein Kamm zur Ausformung der Probenaschen wurde am oberen Rand eingesetzt. Bei Auftragung von quantitativen Proben wurden mehrere Zinken untereinander verbunden, um eine große Tasche zu bilden. Zwischenzeitlich wurden die Proben vorbereitet, indem eine beliebige Menge DNA-Lösung zusammen mit 1/5 Volumen an Probenauftragspuffer vermischt wurde. Das Gesamtvolumen einer Probe betrug im analytischen Fall höchstens 20 µl, im quantitativen Fall höchstens 200 µl. Nach Erhärten des Gels wurde es mit 1x TAE vollständig überschichtet und die Proben in die dafür vorgesehenen Taschen einpipettiert. Zur Auftrennung der DNA-Banden wurde eine Spannung von 10 V/cm Laufstrecke im Gel angelegt. Die Einschätzung der Auftrennung fand optisch statt, als Richtlinie galt, dass die Bromphenolbande bei ca. 6 kbp (0,8% Gel) bzw. 750 bp (3% Gel) und die Xylencyanolbande bei ca. 1 kbp (0,8% Gel) bzw. 120 bp (3% Gel) lief. Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel für mindestens 15 min in einer 0,05% Ethidiumbromidlösung inkubiert, kurz unter ddH₂O abgespült und sofort unter UV-Licht bei 280 nm betrachtet und dokumentiert.

4.1.10 Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Es wurde nach der Vorschrift des Qiagen Gel Extraction Kits gearbeitet. Unter UV-Licht wurden die gewünschten Banden mit einem frisch abgeflammtten Skalpell ausgeschnitten und sofort in Reagenzgefäße überführt, um sie dem potentiell mutierenden Einfluss des UV-Lichts zu entziehen. Anschließend wurde das sechsfache des Gelgewichts an chaotropem Puffer QC zugegeben, bis zur vollständigen Auflösung des Gelstücks bei 50°C inkubiert und auf eine DNA-Bindesäule aufgetragen. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Säule einmal entsprechend der Anleitung mit einem alkoholhaltigen Puffer gewaschen und die DNA abschließend mit 50 µl 50°C warmen TE-Puffer eluiert. Eine

Mengen- und Qualitätskontrolle erfolgte über ein nachgeschaltetes analytisches Gel. Es war unbedingt notwendig, den alkoholhaltigen Puffer immer frisch bereit zu stellen, da andernfalls die Ausbeute wesentlich geringer ausfiel. Die abschließende Elution mit 50°C warmem TE erhöhte die Ausbeute zusätzlich.

4.1.11 Ligationen mit TOPO-Vektoren

Eine Möglichkeit, PCR-Produkte in Vektoren zu klonieren nutzt eine Besonderheit der Taq-Polymerase. Am Ende jedes Zyklus wird das Fragment am 3'-Ende um ein zusätzliches Adenin über die „*template*“-DNA hinaus verlängert. Die so modifizierten Ende wurden von einem mit der TOPO-Isomerase aktivierten Vektor erkannt und in den Vektor eingebaut. Dafür wurde 1 µl PCR Produkt mit 0,5 µl pBAD-TOPO Vektor und 3,5 µl ddH₂O für 5 min bei RT inkubiert und anschließend sofort in chemisch-kompetente Zellen transformiert. Die so klonierten DNA-Fragmente waren nach Extraktion der Plasmide bereit für weitere Experimente.

4.1.12 Ligationen mit nicht-TOPO-Vektoren

Im Fall der Ligation mit nicht-TOPO Vektoren muss unterschieden werden zwischen „*blunt end*-Ligationen“, also ohne DNA-Überhänge an Insert oder Vektor und „*sticky end*-Ligationen“, also mit DNA-Überhängen an 3' oder 5' Positionen. Im ersten Fall wird ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor im Verhältnis 1:3, im zweiten Fall eines von 3:1 verwendet. Im ersten Fall wird eine Inkubationstemperatur von 23°C benutzt, im zweiten Fall von 17°C. Um eine erfolgreiche Transformation zu ermöglichen, wurde eine Gesamtmenge an Vektor von etwa $1,0 \cdot 10^{-14}$ bis $5,0 \cdot 10^{-14}$ mol eingesetzt. Bei niedrigeren Werten ließ die Wahrscheinlichkeit eines korrekten Einbaus des Inserts in den Vektor deutlich nach. Ligationen wurden für mindestens 12 h bei der wie oben ermittelten Temperatur inkubiert.

~ $3,0 \cdot 10^{-14}$ mol	Geschnittene, dephosphorylierte Plasmid-DNA, [] = variierend
~ $1,0 \cdot 10^{-14}$ mol	Geschnittene Insert-DNA
2 µl	10x PufferSystem für Ligase
1 µl	Ligase
ad 20 µl	ddH ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

4.1.13 Konstruktion von PCR-Primern

Für den Großteil aller verwendeten PCR-Primer wurden Standardmethoden zur Primerkonstruktion benutzt:

- die Primerlänge für „*perfect-match*“ lag zwischen 19 und 23 bp;
- die Primer enthielten an ihrem 5'-Ende eine Endonukleaseschnittstelle mit zusätzlichen vier dNTP am 5'-Ende für einfachere Weiterverarbeitung und Klonierung; dies verlängerte den Primer entsprechend um meistens 10 bp;
- am 3'-Ende jedes Primers lagen optimalerweise zwei bis drei G oder C, mindestens jedoch eines;
- der prozentuale GC-Anteil in der bindenden Region sollte möglichst nahe an 50% liegen;
- die Schmelztemperatur lag zwischen 55°C und 65°C;
- die Annealingtemperaturen innerhalb der PCR-Reaktionen entsprachen einer um mindestens 5°C reduzierten Schmelztemperatur.

Für Mutationsprimer nach der pALTER-Methode [4.2.2] wurde die Mutationsstelle zwischen zwei flankierende, perfekt bindende Sequenzen eingebaut. Die Gesamtlänge dieser Primer variierte zwischen 38 und 54 bp, die Schmelztemperaturen lagen hierbei zwischen 78°C und 80°C.

Für Mutationsprimer nach der Quikchange-Methode [4.2.3] wurde eine Gesamtlänge zwischen 29 und 34 bp verwendet, die Mutationen lagen ebenfalls in der Mitte der Primer. Die in diesem Fall verwendeten Primer sind komplementär zueinander.

Zur Berechnung der Schmelztemperaturen T_m wurde in einfachen Fällen, also bei Primern mit einer paarenden Sequenz bis zu 23 bp ohne Einführung von Mutationen, folgende Formel verwendet:

$$T_m = 2 \cdot \Sigma(A + T) + 4 \cdot \Sigma(G + C) \quad (4.1)$$

In den komplexeren Fällen, die durch den gezielten Austausch der Nukleotide zu Fehlpaarungen führten, sowie bei längeren Primern wurde nach Formel (4.2) die Schmelztemperatur berechnet.

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%mismatch \quad (4.2)$$

4.1.14 Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen

Eine Kolonie der gewünschten Bakterien wurde von einer frischen Agarose-Platte in eine 10 ml LB-Kultur überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 50 ml frisches LB mit 0,5 ml der Übernacht-Kultur angeimpft und bei 190 upm bei 37°C bis zu einer OD₄₂₀ von 0,4 bis 0,5 inkubiert. Die Zellsuspension wurde in zwei sterile SS34 Zentrifugenbecher überführt und für 2 h in einem NaCl-Eis-Trockeneis-Wasser-Gemisch zwischen -2°C und -4°C gelagert. Nach Zentrifugation bei 6.000 g für 10 min bei 0°C wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet für weitere 2 h bei etwa -3°C gelagert. Jedes Pellet wurde mit 5 ml einer eiskalten 100 mM CaCl₂ vorsichtig resuspendiert. Dabei war besonders darauf zu achten, dass Kontakt mit den Händen oder sonstigen Wärmeträgern vermieden wurde. Die resuspendierten Zellen lagerten weitere 2 h bei -3°C, bevor sie bei 6.000 g für 10 min bei 0°C abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde entfernt und die Zellpellets in 2 ml 50 mM CaCl₂ 20% Glycerin vorsichtig im Kühlraum resuspendiert. Diese wurden sofort in 50 µl Aliquots aufgeteilt, über Nacht bei -3°C gelagert und am nächsten Tag nach Schockfrostern mit N₂ liq. bei -80°C aufbewahrt. Die Durchführung aller Arbeiten erfolgte bei +4°C.

4.1.15 Transformation

Zur Transformation eines Ligationsansatzes wurde die gesamte Ligation benutzt, zur Transformation von fertig gereinigten Plasmiden nur 1 µl. Chemisch-kompetente Zellen wurden aus dem Gefrierschrank (-80°C) entnommen und 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der entsprechenden Mengen an DNA-Lösungen wurden die Ansätze kurz geschüttelt und sofort für 30 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden für exakt 50 Sekunden im Wasserbad bei 42°C - 43°C inkubiert, für 2 min nochmals auf Eis gestellt und mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt. Nach Inkubation unter Schütteln für 1 h bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert, in 200 µl frisches Medium aufgenommen und auf den mit entsprechenden Antibiotika versehenen LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wuchsen bei erfolgreicher Transformation deutlich sichtbare Kolonien. Je nach vorheriger Art der Ausgangs-DNA wurden zwischen 4 und 16 Kolonien steril abgenommen, in 5 ml LB-Antibiotika Nährmedium überimpft und für einen weiteren Tag bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer Überimpfung auf Ampicillin-selektive Platten war es wichtig, dass die Platten nicht älter als einen Monat waren und während dieser Zeit bei 4°C gelagert wurden, da ansonsten die Gefahr bestand, dass vermehrt Satellitenkolonien auftreten.

4.2 Molekularbiologie Omp32

4.2.1 PCR zur Gewinnung von *omp32* aus genomischer DNA

BamHI -	HindIII -	ApaI -	EcoRV -	
10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	Geschnittene Genomische DNA
3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	10x PCR Puffer für Pfu-Pol.
0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	100x dNTPs
1,6 µl	1,6 µl	-	-	Primer1 (pET17b-For)
2,2 µl	2,2 µl	-	-	Primer2 (pET17b-Rev)
-	-	1,2 µl	-	Primer3 (TOPO-For)
-	-	2,0 µl	-	Primer4 (TOPO-Rev)
3 µl	6 µl	3 µl	6 µl	DMSO 100%
0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	Pfu-Polymerase 2,5U/µl
9,6 µl	6,6 µl	10,2 µl	7,2 µl	ddH ₂ O
30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	Gesamtvolumen

PCR-Programm: 5'-97°C; (1'-94°C; 1'-48°C; 1'-72°C)₂₅; 4 - 4°C

Durch die hier gewählten Primer wurde wie beschrieben das Leaderpeptid entfernt, sowie an der Position +1 ein Met als Translationsstart eingesetzt. Die Expression erzeugte somit Omp32 in Inclusion-Bodies.

Um eine erfolgreiche PCR mit genomischer DNA als „*template*“ zu erhalten, mussten folgende Parameter gewährleistet werden: eine DMSO-Endkonzentration zwischen 5-10%, sowie geschnittene bzw. nur gescherte genomische DNA. Um die Ausbeute zu erhöhen, empfahl es sich, kleine Gesamtvolumina zwischen 30-50 µl zu verwenden, da sich hier die „*ramp times*“ der PCR-Geräte weniger auswirkten und die Proben somit schneller erhitzt bzw. abgekühlt werden konnten. Diese Vorgaben wurden für alle weiteren PCR eingehalten.

4.2.2 Mutagenese mit pALTER Kit

Die erarbeiteten elektrostatischen Omp32-Modelle von Zachariae⁵⁰ ermöglichten eine Voraussage der Leitfähigkeiten und der Selektivität von gezielt mutiertem Omp32. Um diese Aussagen auf ihren Wahrheitsgehalt hin untersuchen zu können, insbesondere bezüglich der

Bestandteile des Arginin-Clusters, müssen entsprechende Mutanten produziert und in geeigneten Experimenten vermessen werden. Aus diesem Grund wurde Omp32 mehreren Mutationen unterzogen, die später in der physikalischen Vermessung Aufschluss über den Einfluss der jeweiligen Mutationen auf die funktionellen Eigenschaften geben sollten.

Der Mutagenesekit von Promega beruht im Gegensatz zu dem häufig verwendeten Standard-PCR-Mutagenesekits nicht auf einer PCR-Reaktion, sondern auf einer speziellen bakteriellen Zelllinie, die DNA-Fehlpaarungen nicht korrigiert. Der Vorteil dieses Systems ist, dass mehrere Mutationen kombinatorisch durchgeführt werden können und es nur dem Zufall und der Kolonienanzahl überlassen ist, welche der theoretischen Mutationen tatsächlich isoliert werden können. Die Selektion der Mutanten erfolgt über einen Wechsel der Antibiotika-Resistenzen. Das Plasmid pALTER-EX1 trägt zwei Gene, die für Antibiotika-Resistenzen gegenüber Ampicillin und Kanamycin codieren. Die Ampicillin-Kassette enthält eine Punktmutation, sodass diese Resistenz im Ausgangszustand nicht aktiv ist. Durch eine Anlagerung der im Kit mitgelieferten Primer der Runde 1 (amp^r , kan^s) ist es während des Mutationszyklusses möglich, die anfängliche Antibiotikaempfindlichkeit auszutauschen. Somit entsteht aus der Kanamycinresistenz eine Sensitivität und aus der Ampicillinsensitivität eine Resistenz.

Dieser Schritt ist wichtig für weitergehende Mutationen sowie deren Selektion. Die in jedem Zyklus immer entgegengesetzten Resistenzen/Sensitivitäten zur vorhergehenden Mutationsrunde ist eine unendliche Anzahl von nachgeschalteten Runden möglich. Durch die Verwendung von amp^r und kan^s in Runde 1, bzw. amp^s und kan^r in Runde 2 wird gewährleistet, dass immer nur eine Resistenz ausgebildet ist. Hierbei wird also immer ein amp und ein kan Primer, sowie immer ein aktivierender und ein deaktivierender Primer eingesetzt.

Die zu mutierende DNA-Sequenz, hier *omp32*, wurde über einen NdeI/EcoRI-Verdau in den Vektor pALTER-EX1 einligiert. Für die eigentliche Mutagenese wurden Primer konstruiert, die zu beiden Seiten der Mutagenese-Position etwa 17-20 bp übereinstimmende Nukleotide aufweisen, aber alle nur an den Antisense-Strang binden können. Die Gesamtlänge eines Primers variierte zwischen 38 und 54 bp.

A. Aufspaltung der „*template*“-DNA über alkalische Denaturierung.

20 µl	pALTER-EX1 aus <i>E. coli</i> JM109, [] = 170 µg/µl
4 µl	2 M NaOH, 2 mM EDTA
16 µl	ddH ₂ O
40 µl	Gesamtvolumen
	5 min bei RT inkubieren,
+4 µl	2 M NH ₄ Ac pH4,6
+150 µl	100% EtOH, 30 min bei -70°C, 15 min abzentrifugieren, SN verwerfen
+400 µl	70% EtOH, 15 min abzentrifugieren, SN verwerfen
+170 µl	50 mM TE, vollständig lösen, Aufbewahrung bei -20°C

B. Anlagerung der Primer an die denaturierte „*template*“-DNA und Mutagenese

Um die Besonderheit der möglichen kombinatorischen Mutagenese dieser Methode vollkommen auszunützen, wurden drei unterschiedliche Ansätze gefahren:

QQQ	EEE	QQQ/EEE	
10 µl	10 µl	10 µl	Denaturiertes Template
1 µl	1 µl	1 µl	Repair-Oligo <i>amp</i> ^r
1 µl	1 µl	1 µl	KnockOut-Oligo <i>kan</i> ^s
0,2 µl	-	0,2 µl	Oligo R38Q, [] = 3,7 pmol/µl
0,25 µl	-	0,25 µl	Oligo R75Q, [] = 3,05 pmol/µl
0,21 µl	-	0,21 µl	Oligo R133Q, [] = 3,55 pmol/µl
-	0,19 µl	0,19 µl	Oligo R38E, [] = 3,85 pmol/µl
-	0,28 µl	0,28 µl	Oligo R75E, [] = 2,65 pmol/µl
-	0,20 µl	0,20 µl	Oligo R133E, [] = 3,8 pmol/µl
2 µl	2 µl	2 µl	10x Reaktionspuffer
4,68 µl	4,66 µl	3,34 µl	ddH ₂ O
20 µl	20 µl	20 µl	Gesamtvolumen

Die Ansätze wurden für 5 min bei 80°C inkubiert, innerhalb von 40 min auf 45°C abgekühlt und abschließend rasch auf RT gebracht. Zur besseren Kontrolle der Temperaturschritte wurde ein PCR-Gerät verwendet. Die fertigen Mutagenesen wurden in *E. coli* ES1301 *mutS*

[4.1.1.] nach Methode [4.1.15.] transformiert. Von angewachsenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert und die relevanten Bereiche sequenziert. Plasmide, die eine Mutation an gewünschter Stelle vorwiesen, wurden mit einem präparativen EcoRI/NdeI-Verdau geschnitten, das entsprechende *omp32*-Fragment isoliert und in pET17b einkloniert, um nachfolgend eine höhere Expressionsrate zu erreichen.

4.2.3 Mutagenese mit Quikchange Kit

Die hier hauptsächlich verwendete Methode zur gezielten Mutation von einzelnen Aminosäuren verwendet als Basisprinzip die PCR, gepaart mit den besonderen Eigenschaften des Restriktionsenzym DpnI. Aus einem Ursprungsplasmid, welches auf beiden DNA-Einzelsträngen methyliert sein muss, wird über Anlagerung von nicht vollständig paarenden Primern in den aufeinanderfolgenden Zyklen die Mutation vereinzelt eingebaut und vermehrt. Nach Beendigung der PCR-Reaktion liegt aufgrund des zyklischen Aufschmelzens/Wiederzusammenfügens von DNA ein Gemisch von vier verschiedenen Varianten vor (p = parental Einzelstrang ohne Mutation, M = Mutierter Einzelstrang):

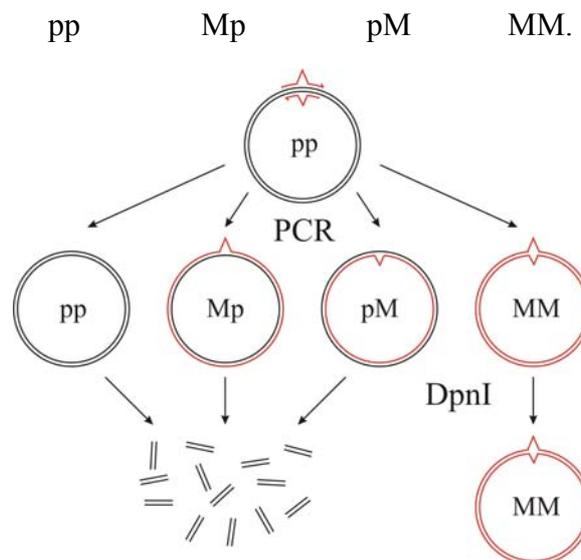


Abbildung 4.6: *Mutagenese nach der Quikchange Methode*

Ausgehend von dem rein parentalen Strang entstehen während der Mutagenese vier mögliche Anordnungen der Doppelstränge. Jede rote Linie entspricht dabei einem mutierten Einzelstrang, der durch die PCR generiert wird und nicht methyliert ist. Beim anschließenden DpnI-Verdau werden alle Plasmide angegriffen, die mindestens einen parentalen Einzelstrang besitzen. Nur ein doppelt mutiertes Plasmid wird nicht angegriffen und kann als Einziges transformiert werden.

Der nachgeschaltete quantitative Verdau mit DpnI (Erkennungssequenz: 5'-Gm⁶ATC-3') schneidet alle Plasmide, die auf mindestens einem der Einzelstränge Methylierungen aufweisen.⁷¹ Die während einer PCR generierten Stränge sind alle unmethyliert, da ihre Grundbausteine die eingesetzten dNTPs sind und diese *per se* nicht methyliert sind. Parentale

Einzelstränge weisen mehrere Methyl-Gruppen auf und sind somit durch DpnI erkennbar. Alle Plasmide, die mindestens einen parentalen Einzelstrang besitzen, wurden angegriffen und geschnitten. Die einzige Kombination aus Einzelsträngen, welche nicht angegriffen wurde, bestand aus zwei während der PCR entstandenen Einzelstränge und wies die Charakteristik MM auf. Diese strikte molekularbiologische Abtrennung ist notwendig, da nur so gewährleistet ist, dass beide Stränge des transformierten Plasmides identisch sind und die DNA-Reparaturmechanismen der Zellen nicht zum Einsatz kommen.

3% DMSO	6,5% DMSO	10% DMSO	
0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	Methylierte Plasmid-DNA, 100 ng/µl
3 µl	3 µl	3 µl	10x PCR Mutagenese-Puffer für Pfu-Pol.
0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	Pfu-Polymerase, 2,5 U/µl
0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	100x dNTPs
10 pmol	10 pmol	10 pmol	Mutagenese Primer1, Sense-Strang
10 pmol	10 pmol	10 pmol	Mutagenese Primer2, Antisense-Strang
0,9 µl	1,95 µl	3 µl	DMSO 100%
ad 30 µl	ad 30 µl	ad 30 µl	ddH ₂ O
30 µl	30 µl	30 µl	Gesamtvolumen

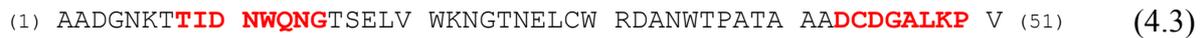
PCR-Programm: 5'-95°C; (30''-95°C; 1'-55°C; 9'-72°C)₁₈; 4-4°C

Nach Beendigung der PCR wurde jedem Ansatz 1 µl DpnI zupipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. 5 µl des fertigen Mutagenese-Ansatzes wurden über ein analytisches Gel auf die Qualität der PCR hin untersucht. Jeweils 15 µl der Ansätze wurden in *E. coli* transformiert. Von am nächsten Tag gut sichtbaren Kolonien wurden zwischen vier und acht Stück ausgewählt, vermehrt, die dazugehörigen Plasmide isoliert und sequenziert. Für die Quikchange Mutagenese erwiesen sich während der Durchführung mehrere Punkte als hilfreich, unter anderem ein geringes PCR-Volumen mit nicht mehr als 30 µl Endvolumen. Ohne den Zusatz von DMSO ergaben sich keine Kolonien und die qualitativ besten DNA-Banden und auch Ansätze zeichneten sich im Bereich von 6,5%-10% DMSO ab. Eine bereits auf dem analytischen Gel nach erfolgreichem DpnI-Verdau sichtbare Bande wies in allen Fällen auf eine zuverlässige Mutagenese hin. Das Fehlen einer sichtbaren Bande bedeutete nicht notwendigerweise ein Scheitern, die Wahrscheinlichkeit für korrekt mutierte Plasmide erwies sich jedoch als geringer.

4.3 Molekularbiologie PAP

4.3.1 Konstruktion von degenerierten PCR-Primern

Die durch die Arbeit von Zeth⁴⁹ durch Proteinsequenzierung bekannte Aminosäuresequenz von PAP lautet:



Aufgrund der gelösten DNA-Sequenz von *omp32* und *omp21* aus *D. acidovorans* konnte die Anzahl der tatsächlich verwendeten genomischen Triplet-Codons pro Aminosäure im Gegensatz zur theoretisch möglichen Menge reduziert werden.

Tabelle 4.2: Summe aller Nukleotid-Triplets für Aminosäuren von *omp32* und *omp21* aus *D. acidovorans*

Tripl.	AA	Anzahl	Tripl.	AA	Anzahl	Tripl.	AA	Anzahl	Tripl.	AA	Anzahl
AAA	K	29	ACA	T	6	AGA	R	17	ATA	I	5
AAG	K		ACG	T		AGG	R		ATG	M	
AAC	N	28	ACC	T	20	AGC	S	17	ATC	I	17
AAT	N	3	ACT	T	4	AGT	S	1	ATT	I	2
CAA	Q	12	CCA	P	1	CGA	R	9	CTA	L	1
CAG	Q	9	CCG	P	4	CGG	R		47	CTG	L
CAC	H	6	CCC	P	9	CGC	R	9	CTC	L	1
CAT	H		CCT	P	1	CGT	R	10	CTT	L	
GAA	E	11	GCA	A	4	GGA	G	1	GTA	V	23
GAG	E	1	GCG	A	4	GGG	G	52	GTG	V	
GAC	D	26	GCC	A	21	GGC	G		18	GTC	V
GAT	D	2	GCT	A	19	GGT	G	18	GTT	V	4
TAA	*		TCA	S	9	TGA	*	2	TTA	L	
TAG	*		TCG	S		TGG	W	5	TTG	L	
TAC	Y	22	TCC	S	11	TGC	C	11	TTC	F	28
TAT	Y	1	TCT	S	1	TGT	C		1	TTT	F

Die obere Tabelle enthält aufsummiert alle Nukleotide und die daraus abgeleiteten Aminosäuren, die in *omp32*³⁹ bzw. *omp21*⁷² auftreten. Es wird rasch ersichtlich, dass mehrere Aminosäuren durch weniger Triplets als verfügbar codiert werden, insbesondere für Leu wird

zu 96% nur ein einziges statt der sechs möglichen Codons verwendet. Ähnliches kann bei fast allen Aminosäuren beobachtet werden.

Tabelle 4.3: Prozentuale Verwendung der einzelnen Triplets in Tabelle 4.2

Tripl.	AA	%-Satz									
AAA	K	0	ACA	T	0	AGA	R	0	ATA	I	0
AAG	K	100	ACG	T	21	AGG	R	0	ATG	M	100
AAC	N	90	ACC	T	69	AGC	S	49	ATC	I	94
AAT	N	10	ACT	T	10	AGT	S	3	ATT	I	6
CAA	Q	57	CCA	P	7	CGA	R	0	CTA	L	2
CAG	Q	43	CCG	P	27	CGG	R	0	CTG	L	96
CAC	H	100	CCC	P	60	CGC	R	47	CTC	L	2
CAT	H	0	CCT	P	7	CGT	R	53	CTT	L	0
GAA	E	92	GCA	A	6	GGA	G	1	GTA	V	0
GAG	E	8	GCG	A	6	GGG	G	0	GTG	V	67
GAC	D	93	GCC	A	44	GGC	G	74	GTC	V	27
GAT	D	7	GCT	A	44	GGT	G	25	GTT	V	6
TAA	*	0	TCA	S	0	TGA	*	100	TTA	L	0
TAG	*	0	TCG	S	20	TGG	W	100	TTG	L	0
TAC	Y	96	TCC	S	29	TGC	C	n.d.	TTC	F	97
TAT	Y	4	TCT	S	0	TGT	C	n.d.	TTT	F	3

Als Folge dieser Beobachtung konnte die theoretische Codonzahl von 64 auf die hier vermehrt auftretenden 29 (rote Markierung in [Tabelle 4.3]) eingeengt werden, wenn eine Ausschlussgrenze von #10% eingesetzt wurde. Die einzige Aminosäure, die sich nur minder eignete für einen Einsatz in degenerierten Primern war Ser, da dieses hier durch drei Triplets codiert wird, die sich zusätzlich an allen Positionen innerhalb des Triplets unterscheiden können. Falls ein Ser in einem degenerierten Primer codiert werden soll, steigt entweder die Anzahl der dafür benötigten individuellen Primer drastisch, oder die Fehlerrate erhöht sich, da die in Frage kommenden Ser-Triplets (TCC/TCG/AGC) an allen Positionen zwei verschiedene Nukleotide aufweisen. Diese können durch die Abkürzung WSS dargestellt werden. Dabei steht W für die Nukleotide für A und T, S für die Nukleotide G und C. Allerdings ergibt sich bei diesem in der Praxis verwendeten Verfahren der Nachteil, dass ungewünschte Triplets entstehen, die nicht für ein Ser codieren, sondern für die Aminosäuren Thr, Arg, Cys, Trp. Nur drei der acht auf diese Weise möglichen Triplets sind Ser-spezifisch,

alle anderen erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Fehlpaarung. Aus diesen Gründen erschien es ratsam, in diesem Fall nach Möglichkeit einen degenerierten Primer ohne Zuhilfenahme von Ser-Triplets zu konstruieren.

Als Grundlage der Primer wurden die in der PAP-Sequenz (4.3) rot-markierten Aminosäuren verwendet. Hierbei musste ein Kompromiss zwischen Spezifität und Länge des PCR-Produktes eingegangen werden. Einerseits sollte die Anzahl der notwendigen degenerierten Primer gering gehalten werden, andererseits musste ein mögliches PCR-Produkt maximale Länge aufweisen, um innerhalb der Trennfähigkeit eines 3%igen Agarosegels zu liegen. Aus diesen Vorgaben wurden die beiden folgenden Primer entwickelt:

Forward-Primer (PAP P1 For):

Aminosäuresequenz	T	I	D	N	W	Q	N	G	
Theoretische Codonanzahl:	4	3	2	2	1	2	2	4	= 768
Ermittelte Codonanzahl:	2	1	1	1	1	2	1	2	= 8
Primersequenz:	AC S ATCGACA A CTGGCA R AACGG (s)								= 23 bp
Echte Varianz:	112111111111111111211111								= 4

Reverse-Primer (PAP P2 Rev):

Aminosäuresequenz	D	C	D	G	A	L	K	P	
Theoretische Codonanzahl:	2	2	2	4	4	6	2	4	= 6144
Ermittelte Codonanzahl:	1	2	1	2	2	1	1	2	= 16
Ermittelte Sequenz:	GACTG Y GACGG Y G C YCTGAAGCC (s)								= 24 bp
Reverse-Complement, Primerseq.:	GGCTTCAG R G C RCCGTC R CAGTC								= 23 bp
Echte Varianz:	111112111112112111111111								= 8

In beiden Sequenzen wurden die Nukleotide, die Varianzen am Ende oder am Anfang der Primersequenzen ergeben hätten, ausgelassen. Aus diesem Wegfall eines „(s)“ (G oder C), am Ende des Forwardprimers, bzw. am Anfang des Reverseprimers erklärt sich in beiden Sequenzen die weitere Verminderung der Varianz im Gegensatz zu den ermittelten „verwendeten“ Codons um den Faktor 2. Bei der Konstruktion der Primer wurden die Richtlinien nach [4.1.13] beachtet. Die Schmelztemperatur berechnet sich für Primer nach der Formel (4.2). S-Nukleotide wurden dabei anteilig mit einem GC-Gehalt von 1 mit einbezogen, R bzw. Y mit 0,5.

Daraus ergaben sich folgende Schmelztemperaturen für die beiden degenerierten Primer:

Forward-Primer: 63,3 °C

Reverse-Primer: 68,7 °C

4.3.2 PCR aus recyclierter verdauter genomischer DNA zur PAP-Isolation

Eine einfache Methode, um ein zum großen Teil unbekanntes Gen aus seinem Genom zu isolieren, ist die cyclische PCR. Im Gegensatz zur normalen PCR, bei der die Primer so ausgerichtet sind, dass sie die dazwischenliegende Sequenz amplifiziert, wird hier „nach außen“ amplifiziert, die meistens bekannte dazwischenliegende Sequenz somit ausgespart. Das Genom des Bakteriums *D. acidovorans* ist zirkulär und weist eine Größe von etwa 4,5 Mbp auf. Theoretisch wäre es möglich, bei jedem zirkulären Genom durch nach außen gerichtete Primer die gewünschte Information eines Gens zu erhalten und nachfolgend zu sequenzieren. Dafür muss allerdings das Grundprinzip der PCR, die exponentielle Vermehrung der Zielsequenz, beibehalten werden. In der Praxis ist dieser Fall nicht möglich, da bereits Entfernungen um die 10 kbp hohe Herausforderungen an eine PCR stellen, hinzu kommt bei sehr großen genomischen Entfernungen noch die Dauer der PCR-Reaktion und damit die Stabilität der beteiligten Komponenten.

Um dieses Problem zu umgehen, muss das Genom in kleinere Abschnitte unterteilt werden, die im recyclierten Fall klar definierte Ausschnitte des gesamten Genoms darstellen. Optimalerweise sind die daraus entstehenden „Mini-Genome“ zwischen 1 kbp bis 8 kbp groß und erlauben so den Zugang zu der auf ihnen enthaltenen Informationen über die Methode der auswärts gerichteten PCR. Unter der Voraussetzung optimaler Bedingungen, insbesondere was die Größe und die Anordnung des gesuchten Fragments auf diesen Mini-Genomen betrifft, führt diese Methode mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Bestimmung der gewünschten Sequenz. Eine Voraussetzung dafür ist, dass die gesuchte Zielsequenz vollständig in einer einzelnen homogenen Untergruppe der recyclierten Fragmente auftritt. Um eine gute Größenverteilung zu gewährleisten, muss das Ursprungsgenom mit Restriktionsenzymen geschnitten werden. Da aber nicht bekannt ist, wie die Schnittstellen eines Restriktionsenzym im Genom angeordnet sind, wird mit einer Vielzahl von Enzymen in Einzelansätzen gearbeitet.

Es lagen nur wenige Informationen zu Anfang der Arbeit über mögliche Schnittstellen vor, aus den gegebenen DNA-Sequenzen^{39,72} ließen sich jedoch Aussagen über den voraussichtlichen GC-Gehalt des Gesamtgenoms machen, der bei *D. acidovorans* etwa 65% beträgt. Über diese Information wurde anschließend eine Auswahl an Restriktionsenzymen verwendet, in der die Frequenz der zu erwartenden Schnittstellen den wichtigsten Parameter darstellt (ApaI, BamHI, BglI, BssHII, EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaI, KpnI, NcoI, NdeI, NotI, PstI, PvuII, SphI, StuI, XbaI). So wurden nur Enzyme ausgewählt, die eine eindeutige

palindromische Nukleotidsequenz aus 6 bp erkennen und zugleich mindestens zwei C oder G enthalten. Die Bedingung einer eindeutigen palindromischen Sequenz ist für die nachfolgenden Recyclisierung von entscheidender Bedeutung, da nur so eine Kompatibilität aller Schnittstellen für die spätere Ligation gewährleistet werden konnte.

Nach erfolgtem Verdau wurden alle Restriktionsenzyme unter Verwendung der Herstellerempfehlungen über Hitze denaturiert und auf ihr 10-faches Volumen verdünnt. Zur Recyclisierung der Fragmente wurden die einzelnen Ansätze identisch wie unter [4.1.12] behandelt und mit einer zweimaligen Zugabe von Ligase geschlossen. Für diesen Schritt war es wichtig, dass die DNA-Konzentration nicht zu hoch ausfielen, mit Werten von höchstens 50 ng/ μ l. Angestrebt wurden ausschließlich Ringschlüsse innerhalb eines Fragments, ohne Einbeziehung von anderen DNA-Stücken. Nur so konnte gewährleistet werden, dass aus der homogenen Gruppe der linearen DNA-Fragmente wiederum eine homogene Gruppe aus zirkulären DNA-Fragmenten entstand, denn nur diese ermöglichten einen erfolgreichen PCR-Ansatz.

Bei zu hoher DNA-Konzentration entstanden stochastische Nebenprodukte, da auch zwei oder mehrere Fragmente miteinander ligiert werden konnten. Bei der anschließenden PCR hätten diese unerwünschten Fragmente über die entstehenden und sich ständig weitervermehrenden PCR-Nebenprodukte in hohem Maße die Spezifität gestört und damit die Qualität der Reaktion. Es gab bis zu diesem Zeitpunkt keine Möglichkeit, diesen Seitenweg der Ligation in diesem speziellen Fall der Recyclisierung vollkommen zu unterdrücken. Nur durch eine niedrige DNA-Konzentration ließ sich dieses Problem mindern, jedoch nicht beheben. Eine Ligation innerhalb eines Fragmentes entspricht einer konzentrationsunabhängigen Reaktion 1. Ordnung, im Gegensatz zur Ligation von zwei oder mehreren Fragmente, die als Reaktion 2. Ordnung von den Konzentrationen der beteiligten Fragmente abhängig ist.

Nach erfolgter Ligation wurden die einzelnen Ansätze über Plasmidisolationskits wieder aufkonzentriert, in TE aufgenommen und standen bereit für die PCR-Reaktion. Zusätzlich wurde eine Kontrolle angesetzt, die alle Materialien bis auf die „*template*“-DNA enthielt und somit den unspezifischen Background der PCR-Reaktion anzeigte.

10% DMSO	20% DMSO	Kontrolle	
3 µl	3 µl	-	Recyclisierte genomische DNA
3 µl	3 µl	3 µl	10x PCR PufferSystem für Pfu-Pol.
0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	100x dNTPs
1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl	Primer1
7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	Primer2
3 µl	6 µl	6 µl	DMSO 100%
0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	Pfu-Polymerase 2,5U/µl
14,3 µl	12,8 µl	17,3 µl	ddH ₂ O
30 µl	30 µl	30 µl	Gesamtvolumen

PCR-Programm: 5'-97°C; (1'-94°C; 1'-43°C; 45''-72°C)₃₀; 4-4°C

Als Primer1 wurden KP_for, Seq_PAP_for und Seq_PAP_for/RI verwendet.

Als Primer2 wurden KP_rev, Seq_PAP_rev und Seq_PAP_rev/RI benutzt.

Die Annealing-Temperatur war hier sehr niedrig angesetzt und wurde im Lauf der Untersuchungen mit Fortschreiten der Ergebnisse an die jeweiligen Bedingungen angepasst, wobei Temperaturen bis zu 62°C benutzt wurden. Nach anfänglichen Erfolgen bei der PCR, aber Misserfolgen bei der Ligation in einen Klonierungsvektor wurden die Primer abgeändert und beide mit einer zusätzlichen EcoRI-Schnittstelle versehen. Mit Hilfe dieser Konstruktion wurde ein Einbau des hauptsächlich auftretenden PCR-Fragmentes in den Vektor pUC18 nach [4.1.12] unternommen.

4.3.3 „Nested PCR“ zur PAP-Isolation

Um die Spezifität weiter zu erhöhen und die Anzahl von unspezifischen Banden zu verringern, wurde weiterhin eine „Nested“ PCR durchgeführt. Ausgehend von dem anfänglichen nach außen gerichteten Primern Lasse_FD/MluI_PAP_for wurden weitere Primer konstruiert, die knapp außerhalb an die Bestehenden anknüpfen. Diese lineare Abfolge von jeweils mindestens zwei hintereinander angeordneten Primern ermöglichte es, in zwei nachgeschalteten PCR-Reaktionen die Spezifität über das zweite, weiter außen sitzende Paar deutlich zu erhöhen. In der ersten Reaktion wurde nach [4.3.2] verfahren und die Reaktion mit dem Primerpaar KP_rev und MluI_PAP_for durchgeführt. Nach Beendigung von 25 Zyklen wurde der Ansatz zusätzlich für 1h bei 37°C mit DpnI verdaut, um die genomische DNA für eine nachfolgende PCR als Template unverfügbar zu machen. Somit blieben nur die

unmethylierten PCR-Produkte aus der ersten Reaktion als mögliche Templates für die nachgeschaltete zweite PCR übrig, wobei nicht mehr als 0,1 µl dieser ersten PCR-Lösung eingesetzt werden durfte. Die Zusammensetzung der zweiten PCR war bis auf das Primerpaar Seq_PAP_rev/RI und PAP_180AA_for identisch mit der ersten PCR. Um zu gewährleisten, dass die zuerst eingesetzten Primer in der zweiten Reaktion keine weiteren Produkte liefern konnten, lag der Schmelzpunkt des zweiten Primerpaars mindestens 4°C über dem des ersten. Deswegen wurde auch die Annealingtemperatur in der zweiten PCR-Reaktion um 4°C gegenüber der Ersten erhöht. Weiterhin wurde die Anzahl der Zyklen in der zweiten Reaktion auf höchstens 15 begrenzt, um so Fehler und Unspezifitäten durch fehlende Nukleotide innerhalb der PCR zu vermeiden.

4.3.4 PCR zur Isolierung von PAP über Zwischensequenzen

Falls *omp32* und *omp21* in einem größeren Cluster von Genen für Proteine der äußeren Membran liegen, kann eine überbrückende PCR durchgeführt werden. Wenn diese beiden Gene nicht direkt nebeneinander angeordnet sind und etwa 8 kbp zwischen ihnen liegen, wäre dabei eine Isolation der innenliegenden Sequenz möglich. Mit etwas Glück ist so eine Aufklärung von *pap* möglich, wenn dieses zwischen *omp32* und *omp21* liegen würde. Da allerdings die Ausrichtung der beiden Gensequenz zueinander bezogen unbekannt ist, mussten vier verschiedene Ansätze durchgeführt werden, um alle Richtungskombinationen und Lagen abzudecken. *Omp21*-spezifische Primer wurden freundlicherweise von C. Baldermann zur Verfügung gestellt.

O21F-O32F	O21F-O32R	O21R-O32F	O21R-O32R	
0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	Genomische DNA
3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	10x PCR Puffer für Pfu-Pol.
0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	100x dNTPs
0,5 µl	0,5 µl	-	-	Primer1 Omp21-F5
-	-	0,5 µl	0,5 µl	Primer2 Omp21-R4b
1,25 µl	-	1,25 µl	-	Primer3 Omp32-RREEE for
-	1,25 µl	-	1,25 µl	Primer4 Omp32-RREEE rev
3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	DMSO 100%
0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	Pfu-Polymerase 2,5U/µl
9,6 µl	6,6 µl	10,2 µl	7,2 µl	ddH ₂ O
30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	Gesamtvolumen

PCR-Programm: 5' -95°C; (30''-95°C; 40''-60°C; 20'-72°C)₃₀; 4-4°C

4.3.5 Direkte Sequenzierung von PAP aus genomischer DNA

Zur Vorbereitung der Proben für die automatische, nichtradioaktive Sequenzierung wurde der ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Analyse der so behandelten Proben wurde von der Firma Medigenomix durchgeführt.

Das System eignet sich zur Sequenzierung von einzel- und doppelsträngiger DNA sowie von PCR-Fragmenten und beruht auf der Methode des Kettenabbruchs. Hierbei wird wie bei einer normalen PCR-Reaktion die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 96 °C in Einzelstränge aufgeschmolzen. Beim Abkühlen auf 53/51 °C hybridisiert der eingesetzte Sequenzierungs-Primer mit einem der Stränge. Ausgehend von diesem Hybrid wird bei 60 °C *in vitro* der komplementäre Strang durch die AmpliTaq DNA Polymerase FS, eine Variante der hitzebeständigen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, mit den vier dNTP ergänzt. Zusätzlich befinden sich in der Reaktionsmischung kleine Mengen von fluoreszenzmarkierten ddNTP, die beim Einbau in den Nukleotidstrang, aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe in 3'-Position, eine Termination der Polymerisationsreaktion hervorrufen. Da die vier Basen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann die Sequenzierungsreaktion in einem Gefäß durchgeführt werden. Der Ansatz enthält nach Durchlaufen mehrerer dieser Zyklen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, deren letztes Nukleotid je nach Base einen der vier Fluoreszenzfarbstoffe trägt. Der Sequenzierungs-Primer wurde so geplant, dass seine

Schmelztemperatur T_m bei ca. 60 °C liegt. Die Schmelztemperatur konnte näherungsweise für Primer bis zu einer Länge von 23 Basen durch die Gleichung (4.1) berechnet werden. Aus *D. acidovorans* gewonnene genomische DNA wurde direkt zur Sequenzierung verwendet.

Betain	DMSO	
10 µl	10 µl	Genomische DNA
16 µl	16 µl	BigDye Sequenzierungslösung
8 µl	-	Betain 5M
-	4 µl	DMSO 100%
1 µl	1 µl	Primer PAP Karin For
5 µl	9 µl	ddH ₂ O
30 µl	30 µl	Gesamtvolumen

Die BigDye Sequenzierungslösung wurde erst dann zupipettiert, wenn der restliche Ansatz bereits für 5 min bei 95°C in der PCR-Maschine inkubierte, da Bestandteile dieser Lösung hitzeempfindlich sind und so ein zu rasches Nachlassen der Polymeraseaktivität vermieden werden konnte.

PCR-Programm: 5'-95°C;
 16 µl BigDye-Zugabe;
 (30''-95°C; 45''-53°C; 4'-60°C)₅₀;
 (30''-95°C; 45''-51°C; 4'-60°C)₄₉; 4-4°C

Da bei einer Sequenzierung die übliche exponentielle Vermehrung des PCR-Produktes entfällt, mussten hier wesentlich mehr Zyklen gefahren werden, um die quantitativ schlechtere, da lineare, Entstehung des Produktes auszugleichen. Die Extensionstemperatur der Sequenzierung war niedriger als die einer normalen PCR, um so eine längere Lebensdauer der Polymerase und dadurch mehr Aktivität über die Gesamtzeit gewährleisten zu können. Nach beendeter Reaktion wurden die Proben über MicroSpin G-50 Säulen aufgereinigt. Die dahinterstehende Methode ist die einer Größenausschlusschromatographie, bei der die nicht in DNA eingebauten Nukleotide größtenteils entfernt werden. Anschließend wurden die Proben auf ein vorbereitetes Sequenziergel aufgetragen und über Elektrophorese aufgetrennt. Diese Arbeit wurde nicht selbstständig durchgeführt, sondern von Fr. Rohdewald (Abt. Oesterhelt, MPI für Biochemie) übernommen. Nach Beendigung der Reaktion wurde die resultierende

genetische Information über BLAST mit bekannten Sequenzen abgeglichen und so auf seine Plausibilität hin untersucht.

4.3.6 Gen-Fishing mit dem WalkerKit

Genomische DNA kann über diese Methode von einer bekannten Sequenz aus nach außen in unbekannte Regionen sequenziert werden, ohne die DNA dafür zyklisieren zu müssen. Dafür wurde 1 bis 10 µg genomische DNA, ähnlich wie bei dem Ansatz der Recyclisierung, mit mehreren Restriktionsenzymen in Einzelansätzen verdaut (ApaI, AlwNI, BglI, BstXI, Eco57I, KpnI, PvuII, PstI, SacI, SacII). Dabei musste darauf geachtet werden, dass alle verwendeten Restriktionsenzyme einen 3'-Überhang generieren, da nur damit die Ligation zu einem aktivierten Linker funktionieren konnten. Die Ansätze wurden bei Temperaturen entsprechend den Herstellerangaben für die Restriktionsenzyme für 1h inkubiert und anschließend dephosphoryliert. Die DNA wurde aufgeschmolzen und ein genspezifischer Primer zupipettiert, der nahe am 3'-Ende der bekannten Gensequenz lag und in Richtung der fraglichen Region verlängert werden kann. Dieser lagerte sich an seine komplementäre Sequenz an und wurde mittels Taq-Polymerase bis an das 5'-Ende seiner Template-DNA verlängert. Durch die Verwendung von Taq-Polymerase entstand kein „blunt end“, sondern ein 3'-Adenin-Überhang, der von der Topoisomerase erkannt wurde. Diese verband den durch die Taq-Reaktion entstandenen Doppelstrang mit einem universellen Linker, auf dem mehrere Primerbindestellen vorhanden sind, um Nested-PCR's durchzuführen. Aufgrund dieser Methode wurden die geschnittenen DNA-Fragmente über die Primerverlängerung an ihren 3'-Ende vereinheitlicht und mit einem definierten Linker als Endstück versehen. Die zwischen den beiden bekannten Sequenzen liegende Information wurde anschließend über eine oder mehrere PCR amplifiziert. Nach einer Ligation dieser Amplifikate in Klonierungsvektoren wurden sie sequenziert und für die nachgeschaltete Verarbeitung zur Verfügung gehalten.

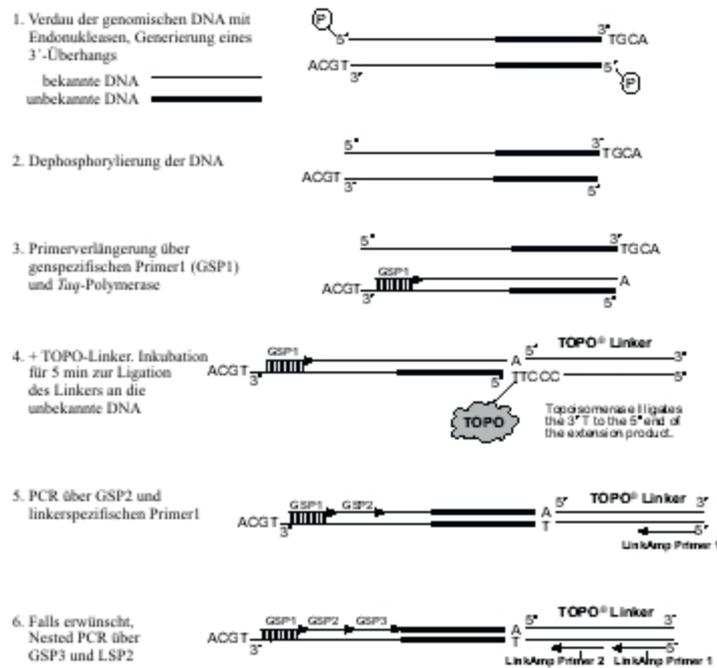


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der DNA-Identifizierung über Walker Kit

Der Verdau mit Endonukleasen erfolgte wie unter [4.1.7] beschrieben mit Dephosphorylierung nach [4.1.8]. Zur Abtrennung der DNA von den restlichen Bestandteilen der Ansätze wurden die Restriktionsansätze über eine Plasmidisolations säule nach Herstellerangaben aufgetrennt. Für die Primerverlängerung und Generierung des Doppelstranges wurde der folgenden Ansatz pipettiert:

5 µl	Geschnittene dephosphorylierte DNA
2 µl	10x dNTPs
2 µl	10x PCR-Puffer für Taq-Polymerase
1 µl	Genspezifischer Primer (Karin PAPfor/Karin PAPrev)
0,4 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
10,6 µl	ddH ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

PCR-Programm: 4' -94°C; (1' -61°C; 20' -72°C)₁; 60' -4°C

Die somit verlängerte DNA konnte nun mit dem aktivierten TOPO-Linker verknüpft werden.

8 μ l	Primerverlängerte DNA
1 μ l	10x PCR-Puffersystem
1 μ l	Aktivierter TOPO-Linker
10 μ l	Gesamtvolumen

Der Ansatz wird für 5 min bei 37°C inkubiert und auf Eis abgekühlt.

Die DNA war anschließend für nachgeschaltete PCR-Reaktionen bereit, sowohl für einfache als auch für Nested-PCR, wobei ein Einsatzvolumen von 0,5 μ l pro Ansatz ausreichend war.

4.4 Analyse von Proteinen

4.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die in den meisten Konzentrationsbestimmungen bei Proteinlösungen verwendeten Bradford-assays waren für eine Messung an Detergens-haltigen Lösungen nicht oder nur eingeschränkt geeignet, da sich die farbgebenden Moleküle Coomassie Brilliant Blue G250 des Bradford-Reagenz an hydrophobe Oberflächen anlagerten, die nicht nur an Proteinoberflächen, sondern auch an Detergensmizellen zu finden sind. Deswegen erwiesen sich Proteinbestimmungen über diese Methode als sehr unzuverlässig und von der Detergenskonzentration abhängig. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Proteinlösungen spektrometrisch bei 282 nm ausgewertet.⁷³

Unter der Annahme, dass Aminosäure-Seitenreste sowohl in 6 M GuaHCl, wie in wässriger Lösung eine identische Absorption aufweisen, weisen die Absorptionskoeffizienten von Trp, Tyr und Cys folgende Werte auf:

$$\epsilon_{(\text{Trp})_{282\text{nm}}} = 5600 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$$

$$\epsilon_{(\text{Tyr})_{282\text{nm}}} = 1200 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$$

$$\epsilon_{(\text{Cys})_{282\text{nm}}} = 100 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$$

In einem Protein addieren sich alle Beiträgen von einzelnen absorbierenden Aminosäuren zu einem gemeinsamen Absorptionskoeffizienten auf, sodass gilt:

$$\Gamma(\text{Trp})A \epsilon_{(\text{Trp})_{282\text{nm}}} + \Gamma(\text{Tyr})A \epsilon_{(\text{Tyr})_{282\text{nm}}} + \Gamma(\text{Cys})A \epsilon_{(\text{Cys})_{282\text{nm}}} = \epsilon_{(\text{Prot})_{282\text{nm}}} \quad (4.4)$$

In Omp32 treten laut DNA-Sequenz im nativen Porin pro Monomer 2 Trp und 16 Tyr auf. Der Absorptionskoeffizient $\epsilon_{(\text{Omp32})_{282\text{nm}}}$ liegt somit rechnerisch bei 30400 l/(mol·cm). Um eine Absorption im UV-Bereich zu messen, wurden Quarzküvetten mit einem Strahlweg von 0,3 cm verwendet. Für die Berechnung wurde das Lambert-Beer'schen Gesetz mit $E = \epsilon_{\text{AcAd}}/MW$, mit E als Absorption, c als Proteinkonzentration [g/l], d als Länge des Strahlweges [cm] und MW als Molekulargewicht der absorbierenden Substanz verwendet. Für Omp32 folgte damit unter Berücksichtigung eines Verdünnungsfaktors VF:

$$c[g/l] = \frac{OD_{282} \cdot 34.815 \frac{g}{mol} \cdot VF}{0,3cm \cdot 30.400 \frac{l}{mol \cdot cm}} = OD_{282} \cdot VF \cdot 3,82 \frac{g}{l} \quad (4.5)$$

Analog wurden alle Proteinbestimmungen vorgenommen, deren Aminosäurezusammensetzung bekannt war.

4.4.2 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE wird die zu analysierende Proteinmischung mit dem stark amphiphatischen Detergens SDS denaturiert und solubilisiert, wobei nahezu alle nichtkovalenten Wechselwirkungen im nativen Protein zerstört werden. Da in Omp32 keine Disulfidbrücken vorliegen, wurde auf Dithiothreitol zur vollständigen Reduktion verzichtet. Die meisten Polypeptide binden SDS in konstantem Gewichtsverhältnis (ca. ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren) und werden durch die stark negativ geladene SDS-Hülle in eine stäbchenartige Form gezwungen, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit und somit die Laufstrecke im Gel proportional zur monomeren Molekülmasse ist. Dieser Fall traf nicht für Omp32 zu, das durch die Zugabe von Probenpuffer ohne Hitzedenaturierung seine natürliche Trimerisierung und damit auch seine Faltung nicht verlor und so bei der Größe eines Trimers mit 105 kDa im Gel gesehen werden kann. Erst durch die Erhitzung von Omp32 mit Probenpuffer und dem darin enthaltenen 1% SDS auf über 75°C gingen sekundär und tertiäre Strukturinformation verloren und das Protein lag als entfaltetes Monomer vor. In der vorliegenden Arbeit wurde der Molekulargewichtsstandards SeeBlue™ Protein Ladder (10 bis 220 kDa) und BenchMark™ Protein Ladder (~10 bis ~190 kDa) verwendet.

Die Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt.⁷⁴ Die aufgetragene Probe wurde hier zunächst in einem Sammelgel konzentriert, um von dort in das Trenngel hineinzuwandern. Zur Herstellung der Gele wurden in einen Gießstand nacheinander je zwei durch 1,5 mm dicke Teflon-Spacer getrennte Glasplatten gelegt und anschließend das 11%ige Trenngel eingefüllt. Zur gleichmäßigen Polymerisation an der Oberfläche des Trenngeles wurden sie jeweils vorsichtig mit 0,4 ml *iso*-Propanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das überstehende *iso*-Propanol abgegossen, die Grenzfläche mit destilliertem Wasser gespült, das Sammelgel eingefüllt und die Gelkämme eingesteckt. Die entstehenden Taschen boten ein Fassungsvermögen von etwa 40 µl.

Trenngel 11%

33 ml	30% Acrylamid
9 ml	10x Trenngelpuffer
0,5 ml	10% Ammoniumperoxysulfat
100 μ l	TEMED
47,4 ml	ddH ₂ O
90 ml	Gesamtvolumen

Sammelgel 3,5%

5,3 ml	30% Acrylamid
4,5 ml	10x Sammelgelpuffer
0,25 ml	10% Ammoniumperoxysulfat
50 μ l	TEMED
35 ml	ddH ₂ O
45 ml	Gesamtvolumen

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit 6 μ l 6x Ladepuffer vermischt, mit ddH₂O auf ein Endvolumen von etwa 35-40 μ l gebracht und zügig mit einer feinen Spritze vorsichtig in die Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese der Lämmli-Gele wurden mit 25 mA pro Gel in 1 x SDS-Elektrophoresepuffer im oberen und im unteren Pufferreservoir durchgeführt.

4.4.3 Coomassie Brilliant Blue R250 zur Färbung von Acrylamidgelen

Zur Analyse der Proteingele wurden die Proteinbanden durch die Behandlung mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei ca. 0,1 μ g Protein je Bande. Diese Methode wurde vor allem für die Analyse der Reinheit von rekombinanten Omp32 nach den einzelnen Reinigungsschritten verwendet.

Nach beendetem Lauf wurde das Gel aus den beiden Glasplatten herausgenommen und das Sammelgel vorsichtig mit einem Skalpell abgetrennt. Die Fixierung des Gels erfolgte für 5 min in einer 12,5% TCA-Lösung. Der Fixierer wurde abgegossen und konnte jederzeit wieder verwendet werden. Das Gel wurde kurz in Wasser gespült und anschließend für 3 h bei RT in 50 ml Färbelösung unter sanftem Schwenken inkubiert. Die Färbelösung konnte nach Benutzung gesammelt und wiederverwendet werden, allerdings musste MeOH nachträglich hinzugefügt werden und die Empfindlichkeit bei weiteren Gelen war geringer. Das Gel wurde

in reinem ddH₂O entfärbt, die ersten Banden waren bereits unmittelbar nach der Färbung sichtbar. Um rascher zu einem klaren Hintergrund zu gelangen, konnte das Wasser auf bis zu 60°C erhitzt werden. In diesem Fall war eine vollständige Entfärbung in unter 1 h erzielbar.

4.4.4 Silberfärbung von Acrylamidgelen

Höhere Sensitivität und damit niedrigere Nachweisgrenzen wurden über eine Anfärbung der Proteinbanden mit Silber erzielt. Diese Methode wurde insbesondere für die Abschätzung des Trimer/Monomer-Verhältnisses benutzt. Das vom Sammelgel befreite Gel wurde zweimal für mindestens 30 min in 50 ml Fixierlösung inkubiert. Nach dreimaliger Inkubation für jeweils mindestens 20 min in 50 ml 50% EtOH wurde das Gel 1 min in 50 ml 200 mg/l Na₂S₂O₃ reduziert. Das Gel wurde zweimal für je 1 min in ddH₂O gewaschen und anschließend für 30 min in 50 ml Silberlösung inkubiert. Nach kurzer Behandlung mit ddH₂O wurde das Gel solange in der Färbelösung geschwenkt, bis die relevanten Banden im gewünschten Färbegrad erschienen. Nach kurzem Waschen in ddH₂O wurde das Gel für 10 min bei 12% HAc inkubiert. Die längerfristige Lagerung erfolgte in ddH₂O. Zur Archivierung wurde das Gel eingescannt und nach Quellen in destilliertem Wasser zum Trocknen im GelAir Dryer zwischen zwei Zellophan-Folien in einem Rahmen eingespannt.

4.4.5 Tryptophan-Emissionsspektroskopie

Die Tryptophan-Emissionsspektroskopie gibt Informationen über das umgebende Medium der aromatischen Seitenreste von Tryptophanen. Im Großteil aller Fälle sind Tryptophane aufgrund der Hydrophobizität ihrer aromatischen Seitenkette im Inneren eines Proteins zu finden, geschützt vor der wässrigen Umgebung. Die Seitenreste entfalteter Proteine sind dem umgebenden Lösungsmittel und damit einer erhöhten Polarität als im nativen Zustand ausgesetzt. Durch die Veränderung der wirksamen Hydrophobizität verschiebt sich das Emissionsspektrum angeregter Tryptophane. In vorwiegend wässriger Umgebung zeigen sie ein Emissionsmaximum bei etwa 355 nm, Tryptophane in hydrophober Umgebung emittieren zwischen 335 und 340 nm.

Gemessen wurden die verschiedenen Rückfaltungsansätze von Omp32 in einem UV/Vis-Spektrometer bei einer Anregungswellenlänge von 282 nm. Die optische Weglänge der Quarzküvette betrug 0,3 cm. In zwei direkt aufeinanderfolgenden Scans mit einer Geschwindigkeit von 100 nm/min wurden die Emissionen zwischen 300-400 nm aufgezeichnet. Über die Lage und die Höhe des auftretenden Emissionsmaximums konnten Aussagen über die Qualität der Rückfaltung getroffen werden.

4.4.6 FTIR-Spektroskopie

Die zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehaltes von Proteinen erfolgte durch FTIR-Spektren, die mithilfe der Attenuated Total Reflection-Technik in einem Spektrometer Nicolet (Typ 740) aufgenommen wurden. Die Proben mussten aufgrund der Sensibilität der Methode frei von einer Vielzahl von störenden Substanzen sein. Dies galt insbesondere für organische Substanzen, die im Puffer enthalten waren und das Spektrum des zu vermessenden Proteins verändern. Es war daher erforderlich, bis auf Omp32 alle enthaltenen Fremdstoffe organischer Herkunft über Dialyse oder sonstige Umpufferungsmethoden [4.6.5] soweit als möglich zu entfernen. Die Messungen erfolgten im Bereich von 4000-1000 Wellenzahlen [cm^{-1}]. Auf den verwendeten Germanium-Kristall wurden 100-200 μl Proteinlösung vollständig eingedampft, in das Gerät eingebracht und nach einer Ruhephase von mindestens 30 min vermessen. Die Anzahl der verwendeten Scans lag nicht unter 256, meist wurden 1024 Durchläufe pro Probe addiert. Für die Analyse der Sekundärstruktur der gemessenen Proteine wurde der Bereich von 1720-1480 cm^{-1} untersucht. Je nach Anteil von ∇ -Helix bzw. \exists -Faltblatt variierte die Höhe und Lage der AmidI-Bande (zwischen 1630-1655 cm^{-1}) und der AmidII-Bande (zwischen 1525 und 1545 cm^{-1})

4.4.7 CD-Spektroskopie

Die Methode der CD-Spektroskopie wird hauptsächlich angewandt, um Sekundärstrukturgehalte von Proteinen zu berechnen. Dabei liegt im Gegensatz zur FTIR-Spektroskopie eine erhöhte Sensitivität in der Detektion von α -Helices. Über den Verlauf der Kurve kann der Anteil der enthaltenen Sekundärstrukturen, also α -Helix, β -Stränge, sowie Random Coils berechnet werden. Die CD-Spektroskopie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Weyher (Abt. Moroder, MPI für Biochemie). Gemessen wurde in einem Jasco J-715 mit einer QS Quarzküvette mit einem Strahlengang von 1 mm. Da in der Probe NaCl in höherer Konzentration enthalten war und Cl^- -Ionen eine Datenerfassung unterhalb von 195 nm erschweren, wurde nur im Bereich von 195–260 nm gemessen. Die anschließende Auswertung der Messdaten erfolgte vollautomatisch und wurde für mehrere Bereiche durchgeführt. Die Daten wurden zudem mit dem Internet-basiertem Programm K2D⁷⁵ (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>) ausgewertet, das ebenfalls den Gehalt der Sekundärstrukturen berechnen kann.

4.5 Proteinproduktion und Aufreinigung

4.5.1 Expression

Zur Expression wurden ausschließlich die Stämme *E. coli* BL21(DE3) pLysS, pLysE oder Rosetta verwendet, da nur hier ausreichende Proteinausbeuten erwartet wurden. Ausgehend von 0,1 ml einer bei -80°C gelagerten Glycerinkultur wurden 100 ml LB mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 190 upm und 37°C wachsen gelassen. Mit jeweils 45 ml dieser Vorkultur wurden mit 1 l LB und entsprechenden Antibiotika beschickte 2 l Schikanenkolben inokuliert. Diese wurden weiter bei 37°C und 190 upm inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine $\text{OD}_{600}(1\text{cm}) = 0,9-1,1$ erreicht hatte. Zur Expression des heterologen Gens wurde nun 1 ml einer 1 M IPTG-Lösung zupipettiert und für mindestens weitere 4 h unter genannten Bedingungen geschüttelt.

4.5.2 Isolation der Inclusion-Bodies

Die Bakterien wurden nach erfolgter Expression für 10 min bei 6.000 g abzentrifugiert und geerntet. Das Pellet wurde in insgesamt 25 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und mit 0,5 ml 10% Lysozym, sowie 50 μl 1 mg/ml DNase versetzt. Die Bakteriensuspension wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend für dreimal je 7 min bei mittlerer Intensität (Stärke 6, 50% Dauer, grosse Spitze) unter Eiskühlung mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss inkubierten die Zellen für weitere 30 min bei 37°C im Wasserbad. Die Zellbestandteile wurden bei 10.000 g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Zur Resuspendierung des Pellets wurden etwa 5 ml ddH₂O zugegeben, das Pellet grob gelöst und in einem Douncer vollständig resuspendiert. Zur Abtrennung der Membranen wurden 5 ml IB-Waschpuffer zugesetzt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Nach kräftigem Mischen und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 10.000 g wurde der Überstand dekantiert, das verbleibende Pellet mit 50 ml ddH₂O gewaschen und in 1 ml ddH₂O resuspendiert. Bis zur Weiterverarbeitung konnten die Inclusion-Bodies bei -20°C gelagert werden.

4.5.3 Kationenaustauschchromatographie

Zur Aufreinigung von heterolog produziertem Omp32 wurde in 8 M Harnstoff gelöstes Protein über eine HighLoad 16/10 SP-Sepharose-Säule gereinigt. Als Trägermaterial diente eine Agarose-Matrix, die über $-\text{SO}_3^-$ Gruppen funktionalisiert worden war. Laut Angabe

waren die funktionellen Gruppen bis zu einem pH von 3 negativ geladen und können damit für eine Kationenaustauschchromatographie benutzt werden. Für die eigentliche Trennung wurde die Proteinlösung mit einer Endkonzentration von 10 mM Zitrat auf pH 3,5 angesäuert, um alle enthaltenen Proteine positiv zu laden und so eine Bindung an das negativ geladene Säulenmaterial zu gewährleisten. Die Kationenaustauschersäule wurde zuerst mit 8 M Harnstoff 10 mM Zitrat pH 3,5 equilibriert, bevor 10-12 ml der Proteinlösung aufgetragen wurden. Um nicht bindende Bestandteile zu entfernen, wurde solange mit dem Equilibrierungspuffer gespült, bis die aufgezeichnete OD₂₈₂ sich an eine konstante Nulllinie angeschmiegt hatte. Erst nach deren Erreichen wurde ein erster linearer Gradient gestartet, der innerhalb von 30 min den pH von 3,5 auf 5,4 anhebt, wobei wiederum 8 M Harnstoff mit 10 mM Zitrat benutzt wurde. Der Durchfluss wurde von Anfang an aufgefangen und in 6 ml Fraktionen unterteilt. Nach Erreichen eines pH-Wertes von 5,4 wurde ein weiterer linearer Gradient angelegt, dessen Start bei 8 M Harnstoff 10 mM Zitrat pH 5,4 und dessen Ende nach 100 min bei 8 M Harnstoff 500 mM NaCl 10 mM Zitrat pH 5,4 lag. Bei einer Flussrate von 1,5 ml/min wurden Fraktionen mit einem Volumen von 3 ml aufgefangen. Nach Beendigung des Gradienten wurde noch für ein weiteres Säulenvolumen mit Puffer gespült, um letzte Reste an gebundenem Protein zu entfernen. Anschließend wurde das System mit 100 ml ddH₂O renaturiert und unter 20% EtOH bis zum nächsten Einsatz gelagert. Jede zweite oder dritte Fraktion wurde auf ein SDS-PAGE aufgetragen. Fraktionen mit genügend hohem Reinheitsgrad wurden vereinigt, nochmals per Gel analysiert und anschließend mit zwei Volumen eiskaltem Aceton ausgefällt. Die Ansätze wurden über Nacht zur Sedimentation der Proteine stehen gelassen. Am nächsten Morgen wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, das Sediment aufgeschüttelt und für 20 min bei 10.000 g unter Kühlung abzentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal vorsichtig mit ddH₂O gewaschen und abschließend luftgetrocknet.

4.5.4 Analytische Gelchromatographie

Gelchromatographien wurden hier nicht zur Aufreinigung der unterschiedlichen Proteine verwendet, sondern zur Abtrennung von Multimeren von Monomeren innerhalb einer Proteinspezies. Zur Abschätzung der unterschiedlicher Rückfaltungsmethoden im möglichen quantitativen Maßstab wurden analytische Gelchromatographien unter identischen Bedingungen verwendet. Um 50 µl einer Proteinlösung aufzutrennen, wurde das SMART System (Pharmacia) verwendet. Die Anlage wurde vor Verwendung mit zwei Säulenvolumen ddH₂O vom enthaltenen Alkohol befreit und durch den Durchlauf von zwei Säulenvolumen Laufpuffer equilibriert. Die Laufgeschwindigkeit des Puffers lag bei 50 µl/min. Nach

Equilibrierung des Systems mit dem Laufpuffer wurden etwa 100 µl Proteinlösung in eine 50 µl Probenschleife eingespritzt. Nach weiteren 5 min wurde die Probe auf die Säule gespült und die Auftrennung der Probenbestandteile nach ihrem Molekulargewicht gestartet. Nach 15 min erfolgte die Aufteilung des Eluats in 80 µl Fraktionen. Diese wurden anschließend über ein SDS-PAGE aufgetrennt und nach [4.4.4] gefärbt.

4.5.5 Präparative Gelchromatographie

Um eine quantitative Rückfaltung mit genügend hohem Trimeranteil aufzutrennen wurde eine präparative Gelchromatographie gefahren. Die Laufbedingungen wurden vorher in analytischen Läufen nach [4.5.4] getestet. Als System für die quantitative Gelchromatographie wurde der Äkta Purifier (Amersham Pharmacia) verwendet. Die Proteinlösung wurde in eine 10 ml Probenschleife gefüllt und diese ohne Luftblasen an das Probenventil angebaut. Die Flussgeschwindigkeit lag bei 3,5 ml/min. Nach einer Prä-Equilibrierung des Systems mit einem Säulenvolumen Laufpuffer wurde die Probe aufgetragen. Die Fraktionierung begann nach 110 ml in Einheiten von je 8 ml und endete nach Durchlauf von insgesamt 270 ml. Nach 335 ml wurde der Lauf abgebrochen und die Fraktionen über SDS-PAGE mit anschließender Färbung nach [4.4.4] analysiert. Gewünschte Fraktionen mit möglichst hohem Anteil an Trimerbanden wurden vereinigt, die Proteinkonzentration nach [4.4.1] bestimmt und die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

4.5.6 Detergensextraktionen

Isolierte Inclusion-Bodies wurden dreimal mit jeweils 2 ml unterschiedlicher Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen gewaschen. Zum Einsatz kamen die folgenden Detergenzien: CHAPS, OG, OTGP, LDAO, SDS, Zwittergent3-14, DDM und OPOE. Die jeweiligen Inkubationstemperaturen wurden dabei teilweise von 50°C über 65°C auf 75°C angehoben. Dies erfolgte unter kräftigem Schütteln für jeweils 15 min. Hierbei gingen teilweise Proteine der Inclusion-Bodies in Lösung. Zur Abtrennung überschüssiger Detergensanteile wurde das IB-Pellet dreimal mit je mindestens 2 ml ddH₂O gewaschen, wobei wiederum die Inkubationstemperaturen von 50°C über 65°C auf 75°C angehoben wurden. Die Proben wurden für 15 min unter kräftigem Schütteln inkubiert, anschließend das feste Protein für 10 min bei 14.000 g abzentrifugiert und von Neuem resuspendiert. Über ein nachfolgendes SDS-PAGE wurde der Reinheitsgrad, die Ausbeute und die Zulässigkeit der jeweiligen Methode evaluiert.

4.6 Rückfaltungen

4.6.1 Omp32 solubilisiert in SDS

Gereinigtes Omp32 sowie mutierte Derivate lagen entweder als gereinigte Inclusion-Bodies oder als ausgefälltes Proteinpellet nach einer Kationenaustauschchromatographie vor. Nach zweifachem Waschen mit je 1,5 ml 75°C warmen ddH₂O wurde das Pellet abzentrifugiert und 100 µl 1% SDS-Lösung zugegeben. Das Pellet wurde nun vorsichtig resuspendiert. Wenn es nicht vollständig in Lösung ging, wurde nochmals 100 µl 1% SDS-Lösung zugegeben. Vor jeder Zugabe wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert, um einen Eindruck sowohl von der Größe als auch der Beschaffenheit des Pellets zu erhalten. Solange sich das Pelletvolumen durch Zugabe von SDS verringerte, ging weiterhin Omp32 in Lösung. War das Pellet allerdings völlig weiß und schien eine schleimig filamentöse Beschaffenheit aufzuweisen, wurde nicht weiter SDS zupipettiert. In diesem Fall bestand das Pellet aus den Überresten der Peptidoglykan-Schicht und enthielt kein lösliches Omp32 mehr. Rückfaltungen wurden entweder als „spontane“ Ansätze oder als langsam faltende Ansätze durchgeführt. Bei den spontanen Ansätzen wurde entweder das Protein in SDS vorgelegt und mit dem fertig vorbereiteten, meist variierenden Rückfaltungspuffer durch rasches Pipettieren verdünnt, oder mit den Einzelkomponenten in rascher Abfolge zusammengebracht. In diesen Versuchen waren die Ansätze nach spätestens 10 min fertiggestellt. Bei den langsamen Ansätzen wurde über eine Peristaltikpumpe ein mindestens 20-faches Volumen an Rückfaltungspuffer unter stetigem Rühren mit einer Geschwindigkeit von 30 µl/min dem in SDS denaturierten Protein unter Kühlung bei 4°C zugeführt. Dieser Vorgang dauerte meistens über Nacht. Es wurde so den Porinen die Möglichkeit geboten, aufgrund der sehr langsamen kontinuierlichen Verdünnung über die längere Aufenthaltsdauer unter immer schwächer denaturierenden Bedingungen ihre optimale Konformation sukzessive zu erreichen.

4.6.2 Omp32 solubilisiert in Guanidiniumchlorid

Gereinigtes Omp32 sowie mutierte Derivate lagen entweder als gereinigte Inclusion-Bodies oder als ausgefälltes Proteinpellet nach einer Kationenaustauschchromatographie vor. Nach zweifachem Waschen mit je 1,5 ml 75°C warmen ddH₂O wurde das Pellet abzentrifugiert, 2 ml 6 M GuaHCl zugegeben und über Nacht bei 56°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand gegen ddH₂O dialysiert, um das darin enthaltene Protein wieder auszufällen. Dieses Pellet konnte nun in 250 µl 6 M GuaHCl aufgenommen werden und stand für

Rückfaltungen bereit. Wie auch in SDS denaturiertes Omp32 gab es spontane, schnelle Rückfaltungen sowie langsamere, in denen der Rückfaltungspuffer über eine Peristaltikpumpe zugegeben wurde. Dies erfolgte ebenfalls unter Kühlung bei 4°C. Im Laufe der Experimente mit GuaHCl denaturiertem Material stellte sich heraus, dass insbesondere Arginin absolut notwendig ist, um die Rückfaltungsansätze in Lösung zu halten.

4.6.3 Omp32 solubilisiert in Harnstoff

Gereinigtes Omp32 sowie mutierte Derivate lagen entweder als gereinigte Inclusion-Bodies oder als ausgefälltes Proteinpellet nach einer Kationenaustauschchromatographie vor. Nach zweifachem Waschen mit je 1,5 ml 75°C warmen ddH₂O wurde das Pellet abzentrifugiert und in wenig 8 M Harnstoff resuspendiert, je nach Größe des Pellets zwischen 100 µl und 1 ml. Die Ansätze wurden nun für 15 min bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert und 10-20 min bei 14.000g und 40°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, aufbewahrt und das Pellet nochmals mit einer identischen Menge an 8 M Harnstoff versetzt. Die Prozedur wurde wiederholt, nur wurde diesmal bei 50°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgezogen und aufbewahrt. Der Schritt erfolgte ein letztes Mal bei einer Inkubationstemperatur von 70°C. Zur Bestimmung der einzelnen Proteinkonzentrationen wurde wie unter Punkt [4.4.1] verfahren. Das denaturierte und gelöste Protein wurde anschließend sofort zur Rückfaltung eingesetzt. Ähnlich wie bei den Rückfaltungen mit SDS gab es Ansätze zum raschen, bzw. langsamen Zurückfalten. Da gegen Ende der Arbeit jedoch nur schnelle Rückfaltungen durchgeführt wurden, werden nur diese hier beschrieben. Auf langsamere Methoden wird im Ergebnisteil eingegangen [5.1.4/5.1.5/5.1.6].

Als Proteinendkonzentration für spontane Rückfaltungen wurden 2 mg/ml angesetzt. Um die Löslichkeit der Proteine während der Rückfaltung zu erhöhen und möglichen Fehlfaltungen mehr Zeit zur korrekten Formbildung zu geben, wurde hochmolares Arginin zugegeben. Um den Einfluss der verschiedenen Detergenzien abschätzen zu können, wurde in den Rückfaltungsexperimenten für jeden aufgereinigten Proteintyp und für jede Aufreinigung ein Screen unter Variierung mehrerer Parameter ausgearbeitet.

4.6.4 Mehrparameter-Tests zur Optimierung

Um den Einfluss von verschiedenen Zusatzstoffen auf die Quantität der Rückfaltung sowie deren Qualität in Bezug auf eine mögliche Trimerisierung zu testen, wurden mehrere Screens unter Variation von verschiedenen Parametern durchgeführt. Anfangs wurde mit dem System FoldIt (Hampton Research) gearbeitet. Dabei wurden unter 16 verschiedenen Rückfaltungs-

bedingungen die Auswirkungen folgender Parameter bei einer Rückfaltung aus 6 M GuaHCl denaturiertem Omp32 getestet: Proteinkonzentration, geladene Additive, pH-Wert, Redoxpotential, chaotrope Salze, Ionenstärke, divalente Kationen, PEG, sowie ungeladene Additive. Die Auswertung erfolgte über die Trp-Fluoreszenz, die als unmittelbare Ergebnisse die Lage und die Höhe des jeweiligen Emissionsmaximums ergab. Bei später durchgeführten Tests wurde als Ausgangsmaterial unterschiedlich denaturiertes Material verwendet. Als Parameter wurden in diesen Versuchen getestet: Proteinkonzentration, Art des denaturierenden Agens, Denaturierungstemperatur, Zieldetergens, Rückfaltungstemperatur, Rückfaltungsdauer, Rückfaltungsvolumen, NaCl-Konzentration, divalente Kationen, Einfluss von Malat, Argininkonzentration, PEG, Reihenfolge der Zugabe bei der Rückfaltung, pH-Wert und Puffersystem. Da meistens Kombinationen der einzelnen Parameter getestet wurden, wird stets darauf geachtet, dass in jedem einzelnen Ansatz nicht mehr als 20 µl denaturiertes Protein verwendet wurden, um den Verlust an Protein gering zu halten. Das Endvolumen betrug immer 100 µl. Die Auswertung dieser Versuche, die nicht über FoldIt durchgeführt wurden, erfolgte ausschließlich über SDS-PAGE. Die Messung der Trp-Fluoreszenz gab Aufschluss über die Qualität der Rückfaltung. Da diese rasch unter Kontrolle gebracht worden ist, war die Effizienz der Trimerisierung entscheidender. Sie konnte mittels Trp-Fluoreszenz nicht nachgewiesen werden, sondern war am schnellsten und zuverlässigsten über SDS-PAGE sichtbar.

4.6.5 Dialysen, Umpufferung

Da sich in der FTIR-Spektroskopie sowie bei den Leitfähigkeitsmessungen die organischen Bestandteile des Rückfaltungspuffers als sehr störend auswirkten, mussten sie entfernt werden. Hierfür wurden in dieser Arbeit zwei Methoden verwendet, die zur Entfernung von Salzen geeignet sind:

- Dialysen wurden bei Raumtemperatur betrieben. Als Dialysegefäß diente eine spezielle Anfertigung aus Edelstahl, die nicht korrodieren konnte. Diese stand in den Volumina 1 ml, 5 ml und 10 ml zur Verfügung. Als Dialysemembranen kam eine SnakeSkin mit einem molekularen Cut-off von 3,5 kDa sowie die Membran Typ 36 mit einem Cut-off von 12-16 kDa zum Einsatz. Dialysiert wurde immer für mindestens 10 h. Einige Ansätzen wurden in zwei oder drei Schritten dialysiert, wobei im ersten Schritt die Tris-, sowie CaCl₂ Konzentration gesenkt wurde, im zweiten und dritten Schritt dann das System gegen des gewünschten Endpuffer dialysiert wurde.

- Umpufferungen wurden über kleine PD-10 Gelfiltrationseinheiten der Firma Amersham Pharmacia Biotech vorgenommen. Hintergrund war hierbei, dass die Proteinverluste vermieden wurden, die durch die Adhäsion von Omp32 an die Dialysemembranen entstanden. Auf die mit 10 ml Zielpuffer prä-equilibrierte Gelfiltrationssäule wurden 2,5 ml umzupuffernde Proteinlösung aufgetragen und mit 2,5 ml Zielpuffer nachgewaschen. Das Eluat wurde aufgefangen und über SDS-PAGE analysiert. Je nach Notwendigkeit musste dieser Schritt mehrmals hintereinander durchgeführt werden, da die Austauschrate mit etwa 90% nicht einer vollständigen Umpufferung entsprach, die insbesondere für FTIR-Messungen [4.4.6] zwingend erforderlich war.

4.7 Malat-Bindungstest

Wie bereits einleitend beschrieben, deuteten mehrere Indizien darauf hin, dass Omp32 als Hauptporin der äußeren Membran von *D. acidovorans* eine Bindungsstelle für Substrate besitzt. Diese Vermutung wurde durch die Berechnungen von Zachariae untermauert.⁵² In den theoretischen Untersuchungen war eine Bindung nachweisbar, jedoch nicht stark ausgebildet. Um diese Aussagen experimentell nachprüfen zu können, wurde ein Bindungstest mit radioaktivem ¹⁴C-Malat entwickelt. Alle Arbeiten mit radioaktivem Material wurden im Isotopenlabor der Abteilung Hartl, MPI für Biochemie durchgeführt.

Tabelle 4.4: Ansatzschema für Malat-Bindungstest

Membran	wWT	wWT denat.	wWT Malat	rWT	rWT Malat	
2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 M Tris pH8,0
2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	6 M NaCl
-	-	4 µl	-	-	-	10% SDS
2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	20% OPOE
10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	¹⁴ C-Malat 7 kBq/µl
-	10 µl	10 µl	10 µl	-	-	wWT, [] = 1,55 mg/ml
-	-	-	-	2 µl	2 µl	rWT, [] = 8 mg/ml
-	-	-	14 µl	-	14 µl	0,5 M Malat pH8,0
24 µl	14 µl	10 µl	-	22µl	-	ddH ₂ O
40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	Summe

Der denaturierte Ansatz wurde für 15 min bei 95°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen zerfiel das Trimer in Monomere, zugleich verlor das Protein seine Struktur und lag entfaltet vor.

Zur Abschätzung einer ersten Größenordnung wurde folgende Rechnungen aufgestellt:

10 µl wWT = 15,5 µg Omp32 ~ 0,46 nmol Omp32; in 40 µl Ψ 11,5 µM Omp32-Lösung

Einer Abschätzung zufolge ergibt eine Zugabe von insgesamt 70.000 Bq radioaktiv markiertes ¹⁴C-Malat auf ein Gesamtvolumen von 40µl eine Endkonzentration von 875 µM radioaktiv markiertes Malat.

$$\frac{70.000Bq}{2 \cdot 10^9 \frac{Bq}{mmol} \cdot 40 \cdot 10^{-6} l} = 875 \mu M \quad (4.6)$$

Dies entsprach bei einer angenommenen Bindungskonstante von 10 mM näherungsweise einer Besetzung von etwa 8% der angenommenen Malat-Bindestellen.

$$\frac{0,875mM}{0,875mM + 10mM} = 8,046\% \quad (4.7)$$

Bei der eingesetzten Proteinmenge bedeutete dies eine Erhöhung der Radioaktivität um 74 Bq. Diese Zahl wäre nur unter optimalen Bedingungen als tatsächliche Veränderung messbar und setzte eine möglichst vollständige Entfernung der unspezifisch gebundenen Radioaktivität voraus.

$$0,46 \cdot 10^{-9} mol \cdot 8,046\% \cdot 2 \cdot 10^9 \frac{Bq}{mmol} = 74Bq \quad (4.8)$$

Als System wurde eine MinifoldI Dot Blot Kammer verwendet. Zwei Seiten Whatmanpapier sowie eine Nitrozellulosemembran ProtanBA85 (alle zugeschnitten auf 11x8 cm) wurden in einer Waschlösung für 30 min vorinkubiert. Der Einbau in die Kammer erfolgte so, dass die Nitrocellulosemembran nach außen zeigte und gut von Flüssigkeiten erreicht werden konnte. Die Klammern wurden so angezogen, dass die Dichtungsringe der einzelnen Kammern gut abschließen und alle Kammern voneinander getrennt waren. Nach Zusammenbau der Kammer erzeugte eine Saugpumpe mit vorgeschalteter Waschflasche den erforderlichen Unterdruck. Vor Auftrag der einzelnen Proben wurde die Anlage einmal für 10 min unter Unterdruck gesetzt, um die überschüssige Flüssigkeit aus der Membran und den Papieren abzusaugen.

Die in [Tabelle 4.4] angegebenen Ansätze wurden bis auf das radioaktive Malat vollständig vorbereitet. Nach Zugabe von jeweils 70.000 Bq werden sie für 1 h bei 37°C inkubiert, um ein Bindungsgleichgewicht zu erreichen. In rascher Reihenfolge und bei Unterdruck wurden die Proben vollständig aufgetragen.

Sofort im Anschluss wurde jede Kammer zweimal mit 0,3 ml Waschlösung gewaschen. Nach Beendigung der Waschprozedur wurde die Anlage für eine weitere Stunde unter Vakuum gefahren, um letzte Flüssigkeitsreste zu entfernen. Die danach trockene Membran wurde vorsichtig mit einer Pinzette aus der Kammer entnommen, die einzelnen Membranabschnitte mit Skalpell und Lineal ausgeschnitten und in mit 3,5 ml Rotiszint eco plus befüllte Szintillationsvials vermessen. Jede Probe wurde dreimal für 10 min einem Protokoll für ¹⁴C-markierte Proben unterzogen und die Daten abschließend ausgewertet.

4.8 Leitfähigkeitsmessungen

Die Bindung von organischen Säuren an Omp32 wurde auch mit Leitfähigkeitsmessungen untersucht. Der Versuchsaufbau gleicht dem von Mathes beschriebenen.⁷⁶ Zur Messung wurde in eine zweikammerige Messzelle ein Septum mit einem Loch von ca. 100 μm Durchmesser eingespannt und anschließend der Flüssigkeitsspiegel in beiden Kammern mit identischen Elektrolytkonzentrationen soweit angehoben, bis die Kammer bis knapp unterhalb des Lochs im Septum geflutet war. Nach Zugabe von Hexan-gelöstem Lipid (Diphtanoyl-Phospholipidcholin) wurde der Spiegel weiter angehoben und dadurch die Lipidmembran über das Loch des Septums gebildet. Detergens-gelöstes Omp32 wurde in eine der Messkammern hinzugefügt und der spontane Einbau in Form von Leitfähigkeitsänderungen aufgezeichnet. Das Signal wurde durch einen Verstärker (EPC-7) multipliziert, im Rechner aufbereitet und ausgewertet. [Abbildung 4.8] Extern wurde eine Spannung von ± 20 mV angelegt, die einen Stromfluss durch die Porine erzwingt. Dieser wird aufgezeichnet und anschließend über die Höhe der aufgetretenen Stufen ausgewertet. Als Ereignisse kommen Poreneinbau, Porenöffnungen und Porenschließungen in Betracht. Die Auswertung erfolgt bezüglich des Stromflusses durch ein einzelnes Porin.

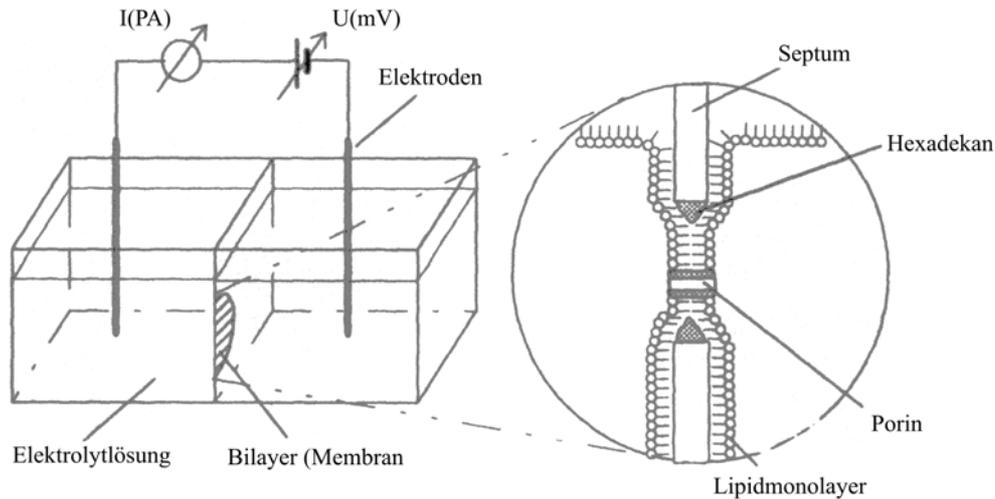


Abbildung 4.8: *Prinzipieller Versuchsaufbau der Leitfähigkeitsmessungen*

Eine künstliche Lipiddoppelschicht überspannt eine kleine Öffnung (\varnothing 60 μm - 1 mm) und trennt zwei wässrige Elektrolytlösungen voneinander ab. Mit Elektroden wird der Ionenstrom durch die Porine in der Membran gemessen.

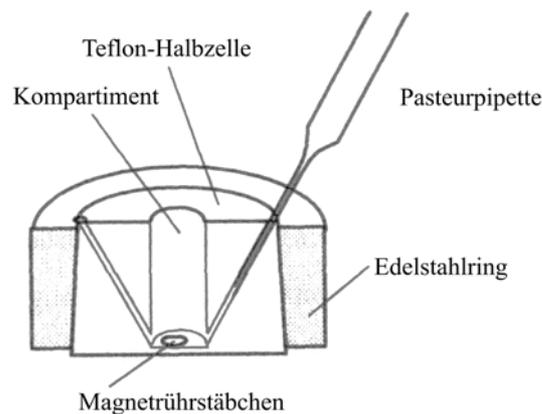


Abbildung 4.9: *Konstruktion einer Hälfte der Messkammer*

Zum Befüllen der Kompartimente werden die Pasteurpipetten in die schrägen Bohrungen der Halbzellen gesteckt. Das Septum liegt planar zwischen beiden Kompartimenten. Durch die konkave Form der Messzelle wird beim Auflegen des Edelstahlringes das Septum fest fixiert.

4.9 Theoretische Untersuchungen

4.9.1 DNA-Analyseprogramme

Zur Bearbeitung der genetischen Information, sowie die Generierung der ursprünglichen Proteindaten kam das DNASTAR-Paket zum Einsatz. Hier wurden vor allem die Unterprogramme EditSeq, MapDraw und MegAlign benutzt. Die Arbeiten hiermit betrafen die Darstellung geeigneter Schnittstellen, die Konstruktion von fertigen Vektorkarten, die Optimierung von PCR-Primern, die Überprüfung von Sequenzierdaten mit den vorgegebenen Daten bei erfolgreicher Mutation, sowie der Vergleich von neu generierter Information mit bisher bekannten Gensequenzen und den daraus resultierenden Folgerungen.

Bei der Arbeit mit PAP wurde das Programm BLAST zur Suche von verwandten Sequenzen in Datenbanken benutzt. Zur Verfeinerung und genaueren Abstimmung mit MegAlign wurde häufig Psi-BLAST verwendet.

Bei der Analyse von DNA-Banden in Agarosegelen wurde ein Programm in Excel geschrieben, das nach Eingabe der Laufstrecken von unterschiedlichen Markern in der Lage war, die Größe der DNA-Banden von Interesse mit hoher Präzision vorherzusagen. Dieses System führte zu sehr präzisen Vorhersagen, die bei der Größenabschätzung von PCR-Produkten sehr hilfreich war.

4.9.2 Protein-Analyseprogramme

Mit Hilfe von BLAST wurden beste Partner für spätere Alignments isoliert und diese mit MegAlign gegen die jeweils bestehenden Information über die Proteinsequenz von PAP abgeglichen. Nach vollständiger Lösung der Sequenz von PAP wurde mithilfe theoretischer Vorhersagen soweit möglich die 3D-Struktur bestimmt. Um einen möglichst guten Vergleich zu erzielen, wurden zusätzliche Proteinsequenzen herangezogen, die entweder Homologie auf der Ebene der Primärstruktur aufwiesen, oder die bekanntermaßen Peptidoglykan binden. Zur Vorhersage der Strukturen kamen die folgenden Programme zum Einsatz:

- SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)⁷⁷
- 3D-JigSaw (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>)⁷⁸
- EsyPred3D (<http://www.fundp.ac.be/urbm/bioinfo/esypred/>)⁷⁹
- Geno3D (http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3d_automat.pl?page=/)⁸⁰

10% DMSO deutlich angehoben werden. Spätere Sequenzierungen ergaben, dass in allen Fällen, in denen DMSO zur Verbesserung der Quantität innerhalb der PCR eingesetzt wurde, keine zusätzlichen zufälligen Mutationen eingebracht wurden.

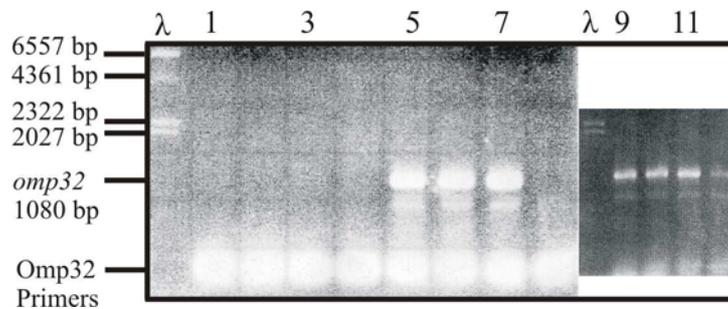


Abbildung 5.2: PCR zur *omp32*-Isolation aus geschnittener frisch isolierter genomischer DNA, unter Variation der DMSO-Konzentration

Banden λ: Marker λ /HindIII; Banden 1-4: 3% DMSO; Banden 5-8: 6,5% DMSO; Banden 9-12: 10% DMSO. Banden 1,4,11: ApaI geschnittene genomische DNA; Banden 2,5,8: BamHI geschnittene genomische DNA; Banden 3,6,9,12: EcoRI geschnittene genomische DNA. Banden 1-3,5-7,9-11: jeweils 3 μ l geschnittene genomische DNA; Banden 4,8,12: jeweils 5 μ l geschnittene genomische DNA

Nach erfolgreicher Amplifizierung des knapp 1000 bp langen Gens von *omp32* wurde das PCR-Produkt im Falle der pET-Primer mit NdeI/EcoRI geschnitten und in den gleichermaßen geschnittenen, zusätzlich dephosphorylierten Vektor ligiert. Hierbei erfolgte ein definierter Einbau des Inserts in den Zielvektor. Die nachfolgende Transformation in XL1 Blue-Zellen benötigte zur Selektion des pET17b-Omp32 Ampicillin-Platten. Aus fünf angewachsenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert und einer Sequenzierung unterzogen. Diese ergab, dass ein fehlerfreies *omp32*-Gen in allen fünf Plasmiden in korrekter Richtung in pET17b eingebaut worden war. Das hierbei entstandene Ursprungsplasmid wird im Folgenden als pET17b-Omp32 bezeichnet.

Wie bereits einleitend erwähnt, wurde die codierende Sequenz von Omp32 um das Signalpeptide verkürzt und weist an der Aminosäureposition +1 ein Met anstelle des nativ vorkommenden pyro-Glutamats vor. Alle folgenden Aminosäuren sind identisch mit der Sequenz des prozessierten nativen Omp32.

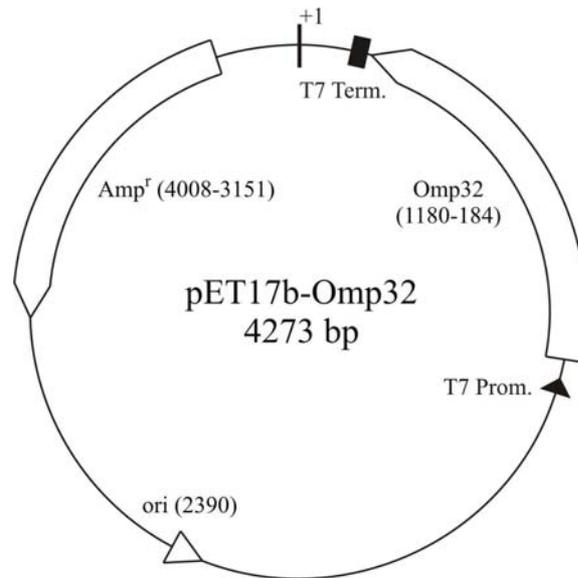


Abbildung 5.3: Plasmidkarte von pET17b-Omp32

Das Fragment, das die Nukleotide 1180 bis 184 enthielt, beinhaltete die spezifischen Elemente zur Expression von *omp32*, sowie dessen Abkömmlinge aus den verschiedenen Mutationsrunden. Der restliche Vektor enthielt den Replikationsursprung (*ori*) und die β -Lactamase als Gen zur Selektion über eine Ampicillin-Resistenz (*Amp^r*).

5.1.2 Mutagenese

Die anfänglich verwendete Methode zur Mutagenese war das pALTER-Kit. Dabei sollte insbesondere der Vorteil der zufälligen Permutationen ausgenutzt werden, um über diese Methode rasch zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Mutanten zu gelangen. Die kompetenten Zellen des Stammes *E. coli* ES1301 *mutS* erwiesen sich jedoch als zu ineffizient, um die Mutationsansätze gut genug transformieren zu können. Dies wurde sowohl durch wiederholte Transformationen, als auch durch mehrmalige Herstellung von kompetenten Zellen demonstriert. Über diese Methode konnte innerhalb eines Schrittes nur die Dreifach-Mutante 5E [Tabelle 5.1] gewonnen werden. Da der Mutagenesevektor pALTER nachweislich geringere Expressionsraten erbrachte als pET17b, musste das Konstrukt 5E anschließend in pET17b umkloniert werden. Dieser Weg erfolgte über einen NdeI/EcoRI-Verdau, mit anschließender Ligation in den in identischer Weise präparierten und dephosphorylierten Vektor pET17b. Dies blieb jedoch der einzige Erfolg der Methode mit pALTER.

Aus Gründen der Rationalisierung sowie der sich bereits andeutenden Anzahl von weniger Schritten durch den Einsatz geeigneterer Mutagenesemethoden wurde diese Möglichkeit verworfen. Alle anderen erzeugten Mutanten wurden deswegen über die Quikchange-

Methode von Stratagene hergestellt. Nach der Reduktion der Mutageneseansätze auf jeweils nicht mehr als 30 µl und der Erkenntnis, dass die Verwendung von DMSO in der PCR-Reaktion häufiger eine amplifizierte Sequenz ergab, erzielten alle darauffolgenden Mutagenesen bereits in der ersten Runde die gewünschte Sequenz.

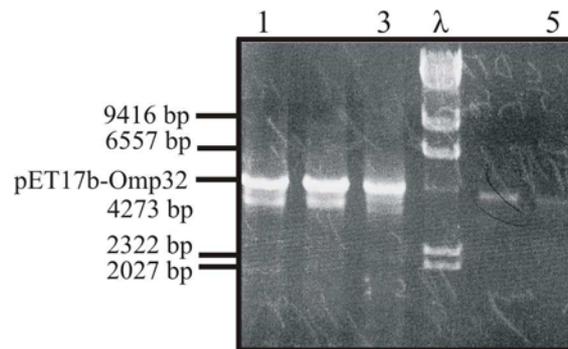


Abbildung 5.4: *Beispielhafte PCR zur Mutagenese von pET17b-Omp32*

Bande λ: Marker λ/HindIII; Bande 1: Generierung von Q1; Bande 2: Generierung von Q2; Bande 3: Generierung von Q3, Bande 4: Generierung von cWT, Bande 5: Generierung von 5R. Alle Ansätze enthielten 10% DMSO. In den Ansätzen 1-3,5 wurde als Template pET17b-Omp32-rWT verwendet, im Ansatz 4 pET17b -Omp32-5E.

Als „*template*“ wurde in den ersten Mutageneserunden immer pET17b-Omp32 verwendet, auf dem die Information für das Porin in einer nahezu Wildtyp-Form vorliegt. Zur Generierung von Mehrfach-Mutanten an den entsprechenden Positionen innerhalb des Arginin-Clusters (z.B. 3Q oder 5Q) mussten mehrere sequenzielle Mutageneserunden durchgeführt werden. In kürzester Zeit konnten über diese Methoden die in [Tabelle 5.1] dargestellten Mutanten generiert werden.

Tabelle 5.1: Generierte Mutanten von Omp32

Pos. 38	Pos. 75	Pos. 133	Pos. 58	Pos. 60	Trivialname	Methode	Runden
R	R	R	E	E	rWT	Ursprung	0
Q	R	R	E	E	Q1	QC	1
R	Q	R	E	E	Q2	QC	1
R	R	Q	E	E	Q3	QC	1
R	R	R	Q	E	Q4	QC	1
R	R	R	Q	Q	Q45	QC	1
Q	Q	R	E	E	Q12	QC	2
Q	Q	Q	E	E	3Q	QC	3
Q	Q	Q	Q	Q	5Q	QC	4
E	R	R	E	E	E1	QC	1
R	E	R	E	E	E2	QC	1
R	R	E	E	E	E3	QC	1
R	R	R	D	E	DE	QC	1
R	R	R	R	R	5R	QC	1
E	E	E	E	E	5E	ALTER	1
E	E	E	R	R	cWT	ALTER/QC	2

Letztendlich liegen alle diese Mutanten sowie rWT als Ursprung aller obiger Mutationen in pET17b vor und werden dementsprechend als pET17b-„Trivialname“ bezeichnet. Von allen Plasmiden wurde zur dauerhaften Lagerung eine Glycerinkultur in XL1 Blue angelegt, die bei -80°C lagert.

5.1.3 Expression

Anfängliche Experimente verwendeten die Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3), sowie *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Diese erwiesen sich unter den gegebenen Bedingungen als nicht optimal für die Aufgabenstellung. Insbesondere bei *E. coli* BL21(DE3) pLysS war die Ausbeute niedrig, ohne dass ein Gewinn an Lebensfähigkeit der Zellen im Gegensatz zu *E. coli* BL21(DE3) zu beobachten gewesen wäre; die Produktion von Omp32 erhöhte wie erwartet nicht die Mortalität der Zellen.

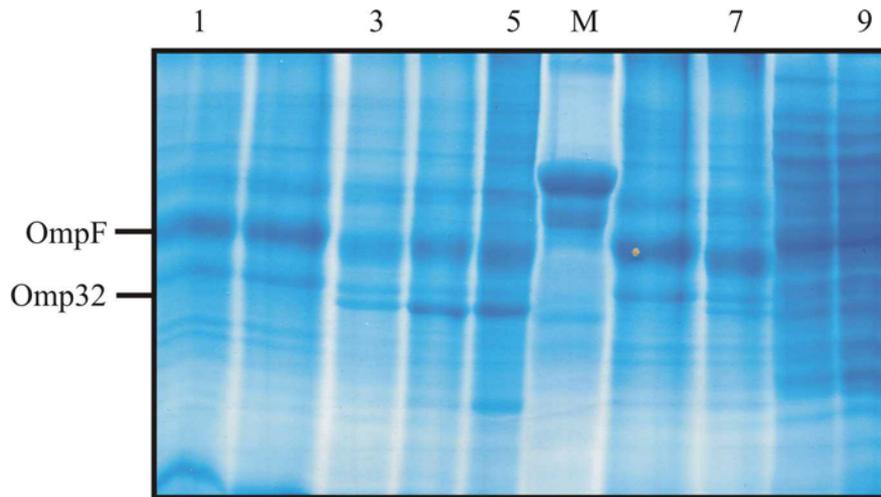


Abbildung 5.5: *Produktion von rWT in E. coli BL21(DE3) pLysS*

Banden 1-5: Pellets nach Zellaufschluss, nach 0/10/30/60/240 min nach Induktion mit 1 mM IPTG; Bande 5: Marker; Banden 6,7: Pellet nach Zellaufschluss, nach 0/60 min, ohne Induktion; Banden 8,9: Überstand nach Zellaufschluss, nach 0/60 min nach Induktion mit 1 mM IPTG – korrespondierend mit Banden 1,2. Die Expression war sehr schwach und eine Proteinbande auf der erwarteten Höhe von Omp32 erst nach 60 min deutlich zu sehen.

Insofern konnte auf die weitere Verwendung von stringenter Expressionsreprimierung verzichtet werden, um die Produktion und die Ausbeute von heterologem Omp32 zu erhöhen. Allerdings war auch die Produktionsrate von Omp32 nach 4 h Induktion mit 1 mM IPTG nicht so hoch wie gewünscht. Insbesondere intrinsische Proteine, allen voran das Porin OmpF aus *E. coli*, traten in den Präparationen in großer Menge im Pellet auf, teilweise sogar in höherer Konzentration als Omp32.

Ursache hierfür war, dass die „codon usage“ für Omp32 zu unterschiedlich ist, um eine effiziente Produktion zu ermöglichen. Dieses Problem ließ sich unter Erweiterung der tRNA-Kapazitäten des Wirtsstammes umgehen, indem der Stamm *E. coli* Rosetta benutzt wurde. Auf dessen zusätzlichen Plasmid pRARE werden die tRNA-Codons für AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC und CGG codiert und stehen somit der Zelle vermehrt zur Verfügung. Nur bei einem der Codons ließ sich eine Verbesserung vermuten; CCC codiert für Pro und wird nativ in *E. coli* für nur 12% aller dort codierten Pro verwendet, Omp32 enthält jedoch neun „CCC“-Codons, was 60% aller darin enthaltenen Pro entspricht. Bereits diese Veränderung in der Wahl des Wirtsstammes erhöhte die Masse an Inclusion-Bodies um mehr als das dreifache, von 10-20 mg auf etwa 50-80 mg pro Liter Kulturmedium.

In anfänglichen Experimenten zur Expression erwies sich, dass eine Induktion mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG einen positiveren Effekt auf die Ausbeute hatte, wenn sie

bei höherer Bakteriendichte zugegeben wurde. Die normalerweise verwendete Induktion bei einer OD_{600} von 0,6 ergab 40% weniger Proteinmasse, zudem wuchsen die Zellen wesentlich schlechter. Induktionen bei einer OD_{600} von 0,9-1,1 führten hingegen zu ausreichendem Zellwachstum, mit einer guten bis sehr guten Expression. Im Großteil der Arbeit wurde deswegen mit dem Stamm *E. coli* Rosetta gearbeitet, der bei einer OD_{600} zwischen 0,9 bis 1,1 induziert wurde. Die Zellernte erfolgte nach 4 h durch Zentrifugation, längere Induktionszeiten erhöhten die Ausbeute nicht weiter.

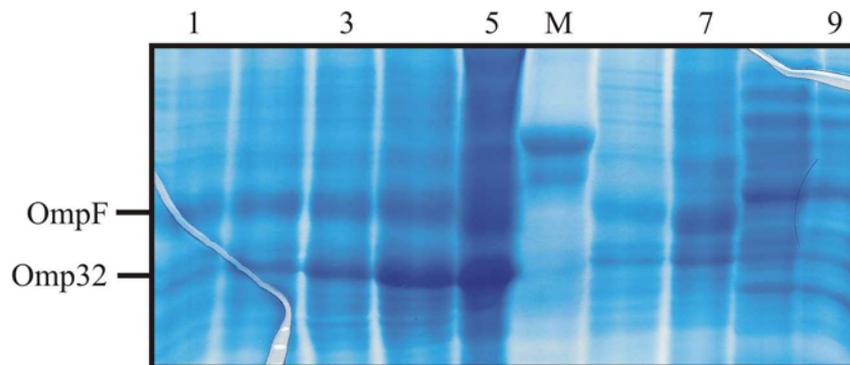


Abbildung 5.6: *Produktion von rWT in E. coli BL21(DE3) Rosetta*

Banden 1-5: Pellets nach Zellaufschluss, nach 0/10/30/60/240 min nach Induktion mit 1 mM IPTG; Bande 5: Marker; Banden 6,7: Pellet nach Zellaufschluss, nach 0/60 min, ohne Induktion; Banden 8,9: Überstand nach Zellaufschluss, nach 0/60 min nach Induktion mit 1 mM IPTG – korrespondierend mit Banden 1,2.

Die gesammelten Pellets wurden nach der Resuspension in Aufschluss-Puffer mit Lysozym und DNase versetzt, um die Stabilität der Zellen bereits vor dem eigentlichen Aufschluss durch Behandlung mit Ultraschall zu schwächen.

Es wurden mehrere Aufschlussmethoden im Laufe der Arbeit eingesetzt; Ultraschall erwies sich dabei als die schnellste, bei zugleich bester Ausbeute. Die Methode des „freeze/thaw“ war für die Masse des Zellpellets bei einer Fermentation im quantitativen Maßstab nicht geeignet, da ein Einfrieren der jeweils etwa 5 g großen Pellets zu lange in Anspruch nahm und ein einzelner Zyklus nicht ausreicht, um alle Bakterien aufzuschließen. Eine reine Behandlung mit Lysozym war ebenfalls sehr zeitintensiv und lysierte nicht im gewünschten quantitativen Maßstab. Ein Aufschluss über Homogenisator war nahezu vollständig, erwies sich aber aufgrund der langen Säuberungszeit für jede einzelne Protein-Spezies als ebenfalls nicht praktikabel.

Die Methode der Wahl war deswegen eine Kombination aus Lysozym und Ultraschall, die in kurzer Zeit bei korrekter Durchführung zu einem guten Ergebnis mit beinahe quantitativ lysierten Zellen führt. Allerdings sanken im Laufe der Zeit anfänglich gute Expressionsraten immer mehr ab, obwohl scheinbar keine Veränderung an den Bedingungen vorgenommen wurde. Diese Beobachtung konnte in allen Fällen anfänglicher Expression gemacht werden, wobei Zelllinien mit häufigem Einsatz besonders geringe Erfolge erbrachten.

Der Grund hierfür war eine Instabilität der Plasmide in den entsprechenden *E. coli* Wirtsstämmen. In der kurzen Zeit, die die entsprechenden Glyzerinkulturen zur Animpfung der Agaroseplatten oder des Kulturmediums aufgetaut waren, gelang es offensichtlich einer unbestimmten Zahl von Zellen, Veränderungen an ihren DNA-Informationen vorzunehmen. Nach etwa fünf bis zehn Zyklen Auftauen/Einfrieren war die jeweilige maximale Produktion des Porins so weit abgesenkt worden, dass so gut wie keine Inclusion-Bodies mehr isoliert werden konnten.

Begegnet wurde diesem Problem durch den Zusatz von sterilen kleinen Glaskugeln zu den Dauerkulturen, die sofort entnommen werden konnten, ohne die vollständige Kultur aufzutauen. Damit kam jedoch ein neuer Nachteil auf, einige der Kulturen wuchsen nicht mehr sofort an, da die Kugeln teilweise nicht mit genügender Menge an lebensfähigen Bakterien besetzt waren. Die Expression von gewünschten Mutanten verzögerte sich häufig, bzw. begann erst nach Zugabe von mehreren Glaskugeln. Abhilfe wurde geschaffen durch die Aliquotierung der Glyzerinkulturen in Fraktionen zu jeweils 140 µl, die einerseits wesentlich rascher dem Tiefkühlschrank (-80°C) entnommen werden konnten, andererseits genügend Bakterien enthielten, um sofort anzuwachsen. Als weiterer Vorteil ergab sich dabei, dass die so angeimpften Kulturen sehr reproduzierbar anwachsen und wie gewünscht Porin in Inclusion-Bodies in reichlicher Menge produzierten.

5.1.4 Aufreinigung

Zur Aufreinigung von rekombinanten Omp32 wurde anfänglich der klassische Weg über Chromatographien gewählt. Nach Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellen bildeten sich drei Schichten: mit der geringsten Dichte die membranösen Überreste der Bakterien, die eine zähflüssige, bräunlich-klare Konsistenz aufwies, eine feine poröse, gräulich-braune Schicht, die die Hauptmasse der Inclusion-Bodies sowie Reste der Zellmembranen enthielt und letztlich mit der höchsten Dichte unaufgeschlossene Zellen, vermengt mit feinem Metallabrieb aus der Ultraschallung.

Das vollständige Pellet wurde direkt mit einer Detergens-haltigen Lösung gewaschen, um die Membranbestandteile zu entfernen. Um die Wirkungsweise verschiedener Tenside auszutesten, wurden Serienversuche vorgenommen und der Detergentyp, die Konzentration sowie die Waschtemperatur variiert. Hierbei zeichnete sich ab, dass OPOE nicht stark genug und SDS zu denaturierend war. Am besten erwies sich Triton-X100, das sowohl die innere, als auch die äußere Membran bei einer Konzentration von 0,5-1,0% vollständig auflöste. Dabei blieben die Inclusion-Bodies intakt und Omp32 wurde nicht angelöst.

Um verunreinigende Proteine aus den Inclusion-Bodies zu entfernen, wurde das so von den Membranen befreite Proteinpellet mit 4,5 M Harnstoff 1% TritonX-100 gewaschen. Überflüssiges Detergens wurde entfernt, indem zweimal mit 4,5 M Harnstoff nachgewaschen wurde. Bei diesen Konzentrationen begann sich ein Teil von Omp32 zu lösen; zudem war der Reinigungseffekt dieses Schrittes als insgesamt gering anzusehen.

Experimente zum Einfluss der Inkubationstemperatur und Sauerstoffeintrag durch unterschiedliche Schüttelgeschwindigkeiten ergaben, dass die als Richtlinien geltenden Werte von 37°C und etwa 200 upm völlig ausreichten. Davon abweichende Parameter brachten keine offensichtliche Verbesserung der Expressionsrate oder der Aufreinigung.

Eines der Hauptprobleme bei der anfänglichen Aufreinigung war die physikalische Ähnlichkeit zwischen Omp32 und dem natürlicherweise in *E. coli* vorkommenden OmpF. Es zeichnete sich in allen bis dahin durchgeführten Aufreinigungen ab, dass ein gewisser Anteil von OmpF in der Präparation nicht zu vermeiden war. Durch die Verwendung von *E. coli* BL21 K8/K9,⁸¹ die beide mehrere Deletionsmutationen von Proteinen der äußeren Membran tragen, konnte eine Mitproduktion und Aufreinigung von OmpF vollständig vermieden werden. In beiden Fällen ging aufgrund der extremen Instabilität und Sensitivität der Zellen die Ausbeute stark zurück. Da bei den nachfolgenden Schritten mit teilweise hohen Verlusten gearbeitet werden musste, konnte nicht auf diese Zellen zurückgegriffen werden, die nur 5-10% der Ausbeute von *E. coli* Rosetta ergaben.

Die einer ersten Reinigung unterzogenen Proteine wurden nun vollständig in 8 M Harnstoff gelöst, mit einem Zitrat-Puffer auf pH3,5 angesäuert und über Kationenaustauschchromatographie aufgetrennt. Dabei zeigte sich, dass diese Aufreinigung keine überzeugenden Resultate lieferte, selbst unter Variation aller Parameter und Pufferbedingungen. Der Hauptpeak in der Chromatographie, der das gewünschte Porin

enthielt, verlief sehr breit und enthielt weiterhin eine Vielzahl störender Proteine, in teilweise nur gering verminderter Konzentration [Abbildung 5.7].

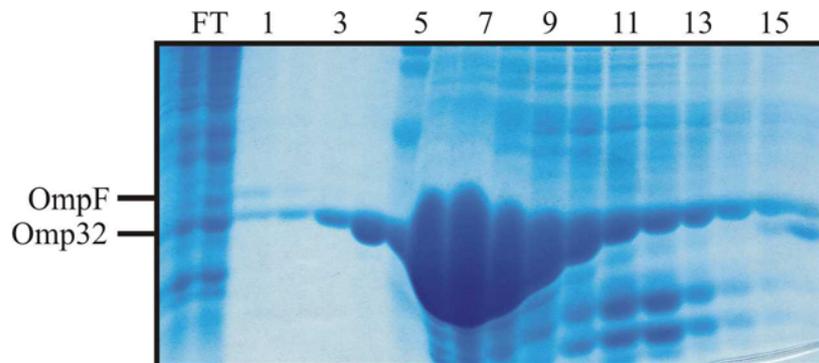


Abbildung 5.7: *Beispielhafte Kationenaustauschchromatographie von rWT*

Banden FT: Durchfluss ohne Bindung an die Matrix; Banden 1-16 : 3 ml Fraktionen im zeitlichen Verlauf. Jeweils 20 µl aufgetragen. OmpF nur in den Banden FT, 1, 2 sichtbar. Gepoolt: Fraktionen 6-8.

Allerdings ließ sich das Porin OmpF fast vollständig abtrennen, weshalb diese Methode zunächst benutzt wurde. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden nach geeigneter Auswahl über SDS-PAGE vereinigt.

Nach der Ionenaustauschchromatographie waren die Proteinkonzentrationen meistens sehr gering. Das Material wurde entweder durch Dialyse oder über die unmittelbare Zugabe von Aceton über Nacht ausgefällt. Die Ausfällung mit Aceton verlief niemals quantitativ, es blieb immer eine konstante Konzentration an Omp32 in Lösung.

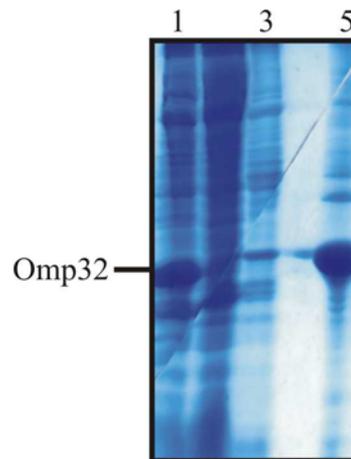


Abbildung 5.8: *Aufreinigungsverluste und Ausbeuten nach Ausfällung von Omp32-rWT durch Aceton*

Bande 1: unaufgeschlossene Bakterien, 4 h nach Induktion, 5 μ l; Bande 2: Überstand nach Zellaufschluss, 20 μ l; Bande 3: Überstand nach Waschung der Inclusion-Bodies mit 2 M Harnstoff, 10 μ l; Bande 4: Aceton-Überstand nach Ausfällen der gepoolten Materials nach der Kationenaustauschersäule mit einer Gesamtmenge von etwa 500 ml, 20 μ l; Bande 5: gepoolter rWT nach Kationenaustauschersäule, 5 μ l.

Ähnliches ergab sich bei der Dialyse, wobei hier die Ausbeute häufig noch wesentlich schlechter ausfiel. Omp32 war hier in der Lage, in seiner denaturierten, monomeren Form die Membranen zu durchqueren und in den Dialysepuffer einzudiffundieren, was mitunter den Verlust der Präparation nach sich zog.

Dieser Schritt nach der Kationenchromatographie war notwendig, aber häufig mit drastischen Proteinverlusten verbunden. Insofern war von Anfang an eine gute Expressionsrate zwingend erforderlich. Das unter guten Bedingungen wiedergewonnene Protein wurde nach mehrfachem Waschen mit Wasser entweder mit Harnstoff, Guanidiniumchlorid (GuaHCl) oder SDS gelöst und stand für Rückfaltungen bereit.

Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie

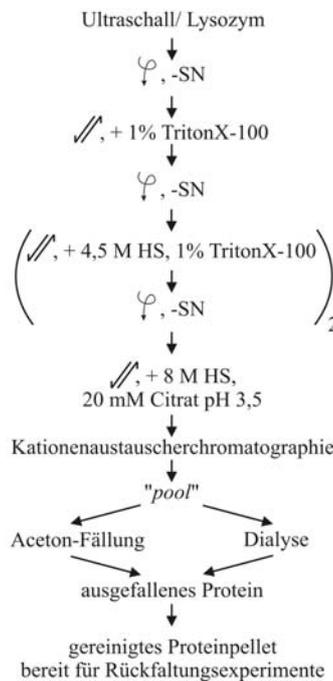


Abbildung 5.9: Flussschema zur Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie

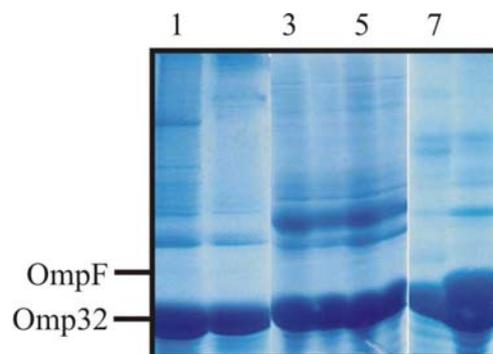


Abbildung 5.10: Über Kationenaustauschchromatographie aufgereinigte Omp32-Derivate

Bande 1: rWT, Feb. 2003; Bande 2: DE, Feb. 2003; Bande 3: rWT, Aug. 2002, Bande 4: Q1, Aug. 2002, Bande 5: Q2, Aug. 2002, Bande 6: Q3 Aug. 2002, Bande 7: cWT Juli 2003, Bande 8: 5Q, Juli 2003. Jeweils 10 µl aufgetragen.

Um das Problem des Proteinverlustes zu vermeiden, wurde im Verlaufe der Experimente eine Reinigungsprozedur ausgearbeitet, die die Ionenaustauschchromatographie umging.

Eine erfolgreichere Methode war, nur über Detergenzien eine Reinigungswirkung zu erzielen. Das Anfangs eingesetzte N-Lauryl-Sarkosin erwies sich als zu denaturierend, da es bei erhöhter Temperatur die Inclusion-Bodies auflöste und somit keine Differenzierung erbringen

konnte. Es wurde allerdings weiterhin als Hauptbestandteil des IB-Waschpuffers eingesetzt, um die Membrananteile unmittelbar nach dem Zellaufschluss quantitativ zu entfernen, da nur bei Raumtemperatur gearbeitet wurde. Die Entfernung der Membranen war essentiell, um einen Großteil von OmpF zu entfernen.

Während des Versuches, schonendere Detergenzien als SDS zur Lösung der Inclusion-Bodies zu finden, erwies sich Zwittergent3-14 als bisher bestes Tensid zur Aufreinigung der Proteinpellets. Es war selbst unter Kochen nicht in der Lage, Omp32 aus den Inclusion-Bodies heraus in Lösung zu bringen, gleichzeitig konnten aber andere Proteine, die als Verunreinigungen enthalten sind, entfernt werden.

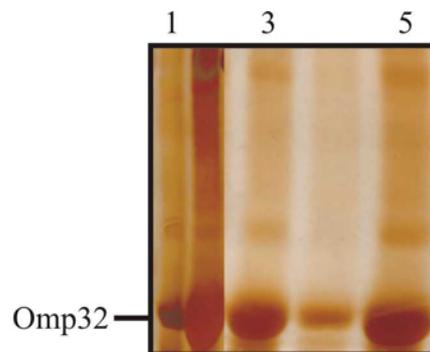


Abbildung 5.11: *Über differentielle Detergenwaschschritte aufgereinigte Omp32-Derivate*

Banden 1, 2: Q1 nach Detergenwaschung mit 8 M Harnstoff unter erhöhter Temperatur eluiert aus den Inclusion-Bodies, bei 37°C, bzw. 95°C; Bande 3: Q2 bei 65°C mit 8 M Harnstoff eluiert; Bande 4: DE bei 65°C mit 8 M Harnstoff eluiert; Bande 5: 5Q bei 65°C mit 8 M Harnstoff eluiert.

Da die Inclusion-Bodies, wie beschrieben, bei dieser Prozedur nicht vollständig aufgelöst wurden, konnte eine Zwittergent3-14 Lösung nicht alle Fremdproteine auswaschen. Der Reinigungseffekt war aber deutlich über nachgeschaltete SDS-PAGE sichtbar und erhöhte die geschätzte Reinheit der Präparation auf etwa 90%. Dabei erwies sich als wichtig, dass die Proteinpellets vor diesen Reinigungsschritten so gut wie möglich resuspendiert wurden, um dem Detergens eine möglichst große attackierbare Oberfläche anzubieten.

Diese Methode bewährte sich insoweit, als mit ihr eine bessere Reinheit der Omp32-Präparationen erzielt wurde als über die Kationenaustauschchromatographie; zudem wurde bis auf eine Präparation alle ausschließlich trimerisierten Mutanten unter Verwendung dieser Methode erzeugt. Die Reinigung erfolgte also nur über die Verwendung unterschiedlicher Detergenzien, verbunden mit erhöhten Temperaturen zwischen 55°C bis 75°C, um Fremdproteine so quantitativ wie möglich zu entfernen.

Aufreinigung über Detergenz

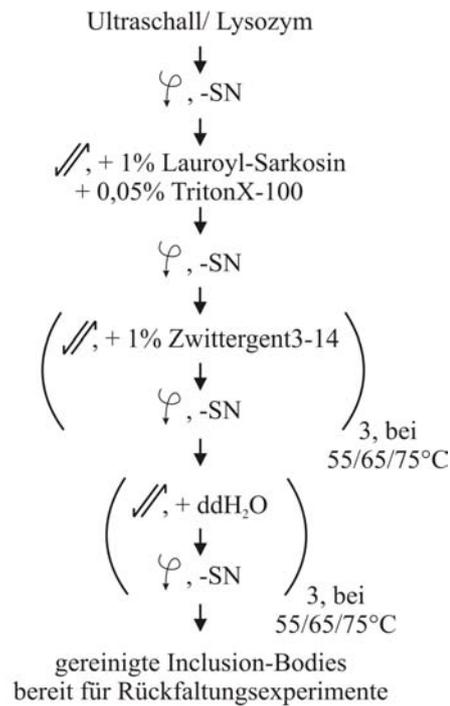


Abbildung 5.12: *Flusschema zur Aufreinigung der Inclusion-Bodies über differentiellen Detergenzien-Einsatz*

5.1.5 Rückfaltung

Ähnlich wie bei der Aufreinigung musste eine Vielzahl von unterschiedlichen Möglichkeiten getestet werden, die einerseits weiterentwickelt wurden, andererseits als ungeeignet verworfen werden mussten, um die Rückfaltungen des gereinigten, in Inclusion-Bodies vorliegenden Omp32 zu optimieren.

Die ersten Versuche gingen von in 6 M GuaHCl denaturiertem Omp32 aus, das in einem Gefäß mit 15 ml vorgelegt wurde und eine geeignete Detergenz-haltige Lösung, die über eine langsam arbeitenden Schlauchpumpe zugetropft wurde. Der Ansatz wurde unter Kühlung bei 4°C ständig gerührt, jedoch deuteten bereits die ersten Zugaben an, dass das Porin eine starke Tendenz zum Ausfallen unter diesen Bedingungen aufwies. Die dabei gemessenen Trp-Fluoreszenzen lagen weit unterhalb derer, die von nativem Omp32 bekannt sind. Kontrollen mittels SDS-PAGE bestätigten, dass sich nur wenig Porin in Lösung befand und dieses zudem nur in der monomeren Form vorlag.

Um weitergehende Informationen über mögliche Zusätze zu erhalten, die einen positiven Einfluss auf die Rückfaltung hatten und insbesondere eine Erhöhung der löslichen Proteinkonzentration bewirkten, wurde das unter [4.6.4] beschriebene FoldIt Kit verwendet.

Dabei werden in mehreren Ansätzen die Einflüsse von Additiven quantifiziert und ermöglichen so eine Beurteilung, welche Additive sich hilfreich auf die Rückfaltung auswirken. Die eigentlichen Ergebnisse wurden durch die Trp-Emissionen bewertet, die sowohl von der Lage des während eines Rückfaltungsansatzes entstehenden Emissionsmaximums als auch von dessen Höhe her gut quantifizierbar waren. Das Maximum der Trp-Emission von nativem Omp32 liegt bei 337,5 nm bei etwa 400 FU Aml/mg. Es wurden 16 Ansätze überprüft [Tabelle 5.2] und entsprechend ausgewertet [Tabelle 5.3].

Tabelle 5.2: Tryptophan-Emissionen nach FoldIt-Assay

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
FU(max)	15,68	21,89	21,95	20,71	16,7	61,70	15,68	21,89
Ansatz	9	10	11	12	13	14	15	16
FU(max)	65,60	72,36	19,98	20,85	23,44	17,25	74,28	15,70

Tabelle 5.3: Auswirkungen der einzelnen Komponenten im FoldIt-Assay

Komponente	Ø FU	Komponente	Ø FU	Komponente	Ø FU
Tris pH8,2	45,8	EDTA	44,5	Saccharose/Arginin	45,2
MES pH6,5	32,5	Ca ²⁺ /Mg ²⁺	33,7	Saccharose	31,8
Hoch Salz	40,2	Hoch Protein	56,4	Arginin +	45,9
Niedrig Salz	38,1	Niedrig Protein	109,4	Arginin -	33,8
PEG +	39,5	Redox +	42,1	DTT +	36,2
PEG -	38,8	Redox -	36,2	DTT -	42,1
Guanidinium +	46,3	Malat +	30,8	Detergens (LS)	39,6
Guanidinium -	32,0	Malat -	47,5	Detergens -	38,7

Es sind diejenigen Komponenten rot markiert, deren Einsatz eine eindeutige Erhöhung der Trp-Emission ergab. Der hohe Wert bei „Niedrig Protein“ hat seinen Ursprung in der Anpassung der Proteinkonzentrationen zwischen „Niedrig Protein“ und „Hoch Protein“ über einen Multiplikationsfaktor in der Auswertung. Aus direkt im Anschluss erfolgten Versuchen zeigte sich, dass die erforderliche Guanidinium-Konzentration bereits über die Zugabe der Protein-Lösung abgedeckt wurde und dass eine weitere Zugabe sich als hinderlich erwies. Über die Kombination aller restlichen Komponenten mit positiven Auswirkungen (Tris

pH8,2, hochmolare Salzlösung, PEG +, Guanidinium -, EDTA +, Arginin +, DTT -, Redoxsystem +, Malat -), 1% OPOE und unter Verwendung von „Hoch-Protein“ ließ sich eine Trp-Emission von 200 FU und damit ein deutlicher Rückfaltungseffekt beobachten.

Versuche im quantitativen Maßstab, die die obigen Bedingungen aufwiesen, blieben anfangs klar und zeigten keinen oder nur wenig Niederschlag. Da die Hilfsstoffe allerdings für fast alle geplanten späteren Anwendungen wie 2D-Kristallisation und Leitfähigkeitsmessungen einen störenden Einfluss besaßen und auch eine Vermessung der Sekundärstruktur über FTIR unmöglich machten, wurden diese zumeist über Dialysen entfernt.

Abgesehen von dem bereits angesprochenen Problem, dass ein Teil der Porine in der Lage war, die Dialysemembran zu durchqueren und so die effektive Proteinkonzentration deutlich sank, fielen die Proteine beinahe quantitativ in allen Rückfaltungsexperimenten mit Guanidinium-denaturierten Omp32 aus.

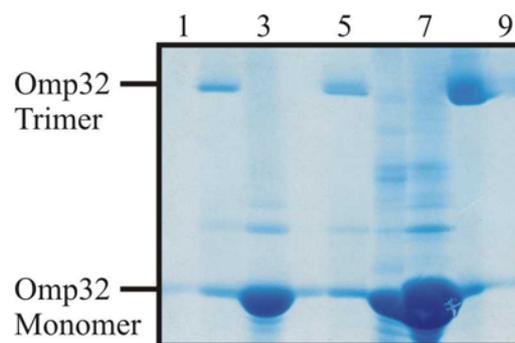


Abbildung 5.13: *Einfluss der Dialysen auf die Proteinkonzentration*

Banden 1,4,9: externer Überstand nach den jeweiligen Dialysen, 30 µl; Banden 2,5,8: teilweise trimerisierte Omp32-Lösungen innerhalb der Dialysekammern zum Ende der Dialysen nach 3 Tagen, 30 µl; Banden 3,6,7: zu Beginn der Dialysen direkt abgenommene Proteinlösungen, jeweils in 8 M Harnstoff denaturiertes Omp32, 5 µl. Banden 1-3: rWT; Banden 4-6: Q45; Banden 7-9: 5Q.

Durch die Dialyse sank die Konzentration der „Hilfsstoffe“ zu sehr ab, als dass diese die Löslichkeit der offensichtlich nicht korrekt gefalteten Porine weiterhin hätten aufrechterhalten können. Die dabei gemessenen Trp-Emissionen, jeweils vor und nach Durchführung der Dialyse, ergaben häufig ein Abfallen der Emission auf 15-20%, wobei dieses Verhalten mit der Proteinkonzentration nicht einherging. Darauf bezogen reduzierte sich hierbei die Endkonzentration auf höchstens 10% der anfangs eingesetzten Proteinmengen. Hinzu kam, dass das so ausgefallene Protein nicht mehr mit GuaHCl gelöst werden konnte, sondern verloren ging.

Rückfaltung/Trimerisierung über GuaHCl



Abbildung 5.14: Flussschema zur Rückfaltungs-/Trimerisierungsansätzen mit GuaHCl

Ausgangsmaterial ist Omp32, das nach der Reinigung über Kationenaustauschchromatographie ausgefällt worden ist.

Um dieser Problematik zu entgehen, wurden Versuchsreihen durchgeführt, bei denen unterschiedliche Parameter (Art des Enddetergens, Arginin-, Guanidinium-, PEG6000-, Na/KCl-, Mg/CaCl₂-Konzentration, pH-Wert) nach dem Prinzip des FoldIt Kits [4.6.4] untersucht wurden. Bereits hier ergaben sich die ersten Kontroversen zu früheren Ergebnissen; EDTA hatte hier einen offensichtlichen negativen Einfluss. Die so gewonnenen Informationen wurden in einem größeren Ansatz berücksichtigt, der als Omp32-denaturierendes Agens SDS enthält. Als Zieldetergens wurde 1% DDM verwendet, Hilfsstoffe waren 300 mM NaCl, 10 mM KCl, 20 mM Phosphat-Puffer pH 8,2 und 0,3 M Arginin. Hiermit ergab sich auf Antrieb mit 270 FU eine starke Fluoreszenz, zudem war der Ansatz entgegen bisherigen Beobachtungen ohne zusätzlichen Niederschlag dialysierbar und konnte letztendlich auf 0,35% OPOE, 5 mM NaCl und 5 mM Phosphat-Puffer pH8,2 eingestellt werden. Unglücklicherweise lag Omp32 vollständig als Monomer ohne Trimerisierung vor, wie ein nachgeschaltetes SDS-PAGE demonstrierte.

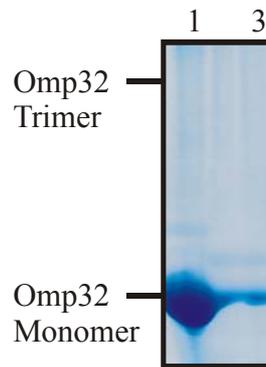


Abbildung 5.15: Großer Rückfaltungsansatz von Omp32-rWT mit DDM über Dialyse

Bande 1: Omp32-Rückfaltungsansatz direkt nach Pipettierung (Gesamtmenge 10 ml); Bande 2: Äußerer Überstand nach Beendigung der Dialyse nach 48 h (Gesamtmenge 220 ml); Bande 3: Dialysat nach Beendigung der Dialyse nach 48 h (Gesamtmenge 11 ml).

Zudem wiesen FTIR-Messungen nach, dass die Proteine scheinbar nicht vollständig gefaltet waren, da hier zusätzliche Banden auftraten, die von dem bekannten nativen Omp32 und dessen Bandenmuster stark divergieren [Abbildung 5.16]. Deshalb wurden diese Proben als fehlgefaltet betrachtet und letztlich die Methode insgesamt verworfen.

Wie sich später herausstellte, lag das Problem der scheinbar fehlgefalteten Omp32-Spezien nicht an der Faltung an sich, sondern an den FTIR-Messungen. Das verwendete ddH₂O stellte sich als nicht absolut rein heraus, sondern enthielt Spuren des Ionenaustauscherharzes, über welches es gereinigt wurde. Der Anteil des verunreinigenden Harzes war aber nicht verlässlich quantifizierbar, da die einzelnen Chargen des benutzten Wassers unterschiedliche Mengen des verunreinigenden Harzes in den einzelnen Proteinproben enthielten. Die Verunreinigung konnte optisch durch Eindampfen von 200 µl ddH₂O nachgewiesen werden, da bereits in diesen geringen Mengen ein deutlicher weißer Rückstand auf dem FTIR-Kristall sichtbar wurde.

Wegen der nicht zuverlässigen Zuordnung der sich überlagernden Spektrumanteile war nie eine exakte rechnerische Entfernung des Signals durch die Verunreinigungen möglich.

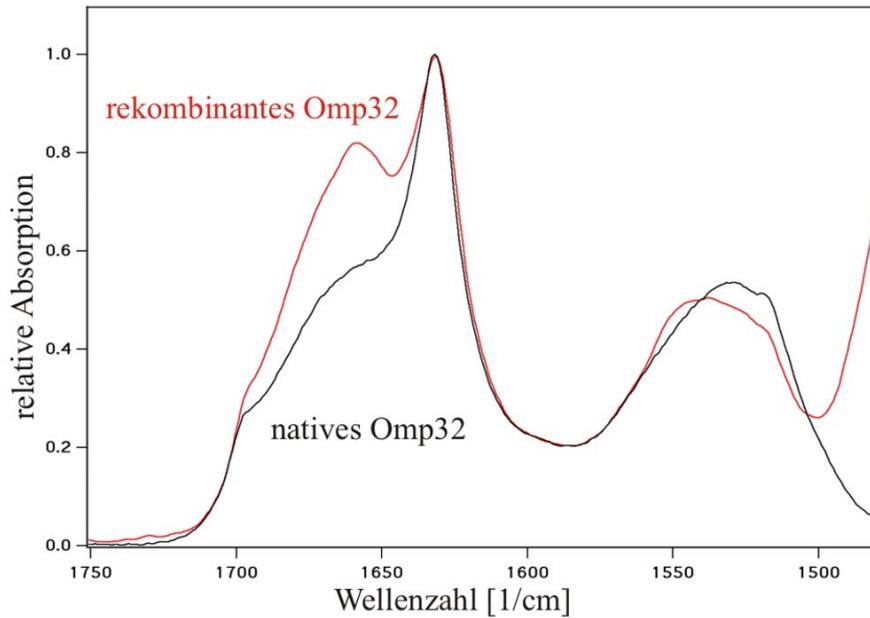


Abbildung 5.16: FTIR-Messungen von nativem und rekombinatem Omp32

Die schwarze Linie repräsentiert eine ältere Omp32-Präparation, die nativ aus dem Wildtyp-Organismus isoliert wurde. Hauptcharakteristika waren ein ausgeprägtes Maximum bei 1628 Wellenzahlen (WZ) sowie eine sanft abfallende Schulter bei etwa 1670 WZ. Die rote Linie stellt über 8 M Harnstoff rückgefaltetes rWT dar, das zusätzlich zu dem exakt gleichen Maximum bei 1628 WZ keine Schulter aufwies, sondern ein zweites Maximum bei etwa 1670 WZ. Dies stammte allerdings nicht, wie ursprünglich berechnet, aus zusätzlichen Anteilen von α -Helix, sondern war auf Kontaminationen im ddH_2O zurückzuführen.

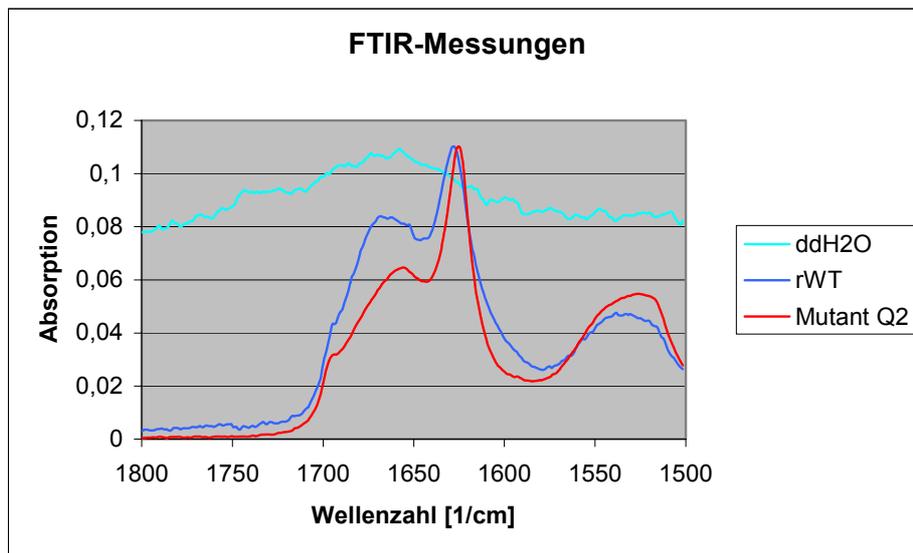


Abbildung 5.17: Einfluss von ddH_2O auf die FTIR-Messungen

Je höher die Proteinkonzentrationen der vermessenen Proben, desto niedriger gestaltete sich das Nebenmaximum bei 1660-1670 WZ. Es gab jedoch keine Probe an rekombinatem Material, die einen identischen Verlauf mit der Sollkurve des nativ gereinigten Omp32 aufwies. Die Verunreinigung durch ddH_2O schlug sich in einem breiten Peak in der Gegend um 1665 WZ nieder. Die Annahme, dass diese Proben fehlgefaltet waren, konnte somit nicht mehr gesichert aufrecht erhalten werden. Aufschluss darüber lieferte CD-Spektroskopie.

Immerhin war es nun möglich, die Spektren im nachhinein näherungsweise zu korrigieren. Letztendlich ging aufgrund dieses methodenimmanenten Fehlers für eine nicht unbedeutende Zeitspanne viel Material verloren, da es als unzureichend gefaltet betrachtet wurde.

Eine abschließende Bestätigung, dass das Porin im rückgefalteten, löslichen Zustand eine native Faltung aufwies, gelang durch CD-Messungen, die in Verbindung mit Analysen über SDS-PAGE Klarheit über die tatsächlichen Verhältnisse der Rückfaltung brachten.

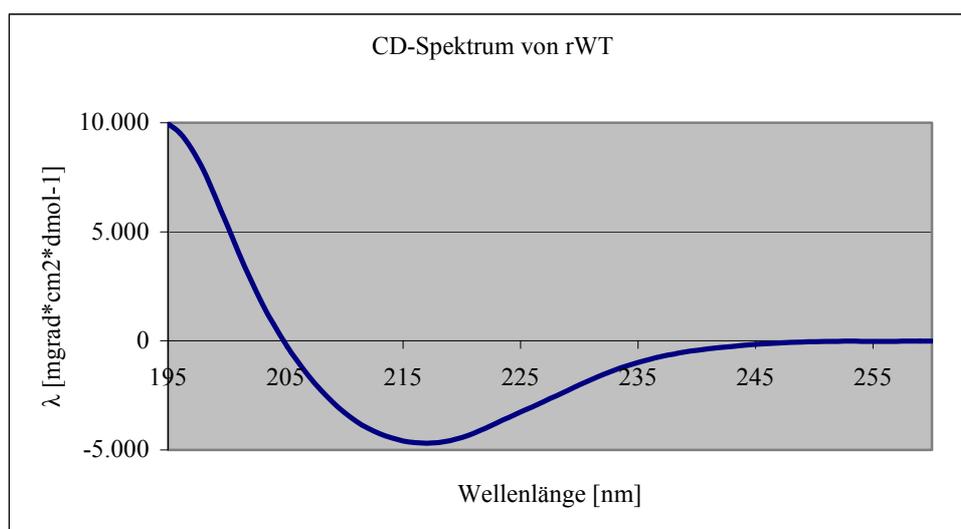


Abbildung 5.18: CD-Spektrum von rWT zur Verifikation der korrekten Sekundärstruktur nach Rückfaltungsansätzen

Tabelle 5.4: Prozentuale Anteile von Sekundärstrukturen in rWT durch Auswertung des CD-Spektrums in unterschiedlichen Bereichen

	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm	K2D ⁷⁵	Krist.Struk.
α -Helix	13,1	12,0	8,6	8,7	5,0	4,0
β -Faltblatt	58,0	55,3	56,2	56,9	48,0	61,0
Random Coil	31,5	34,2	34,9	35,1	48,0	35,0
Summe	102,6	101,4	99,7	100,7	100,0	100,0

Im Laufe der Arbeit wurde zusätzlich die relative Menge des auftretenden Niederschlages als Bewertung zur Effektivität der Rückfaltung herangezogen, da korrekt gefaltetes Protein ohne den Zusatz von hochmolaren Hilfsstoffen aus der Lösung ausfiel. Da DDM sich ebenfalls

nicht als optimales Detergens erwies, insbesondere die Trimerisierung betreffend, wurde dieses aus allen Folgeexperimenten entfernt und durch Detergenzien mit Octyl-Gruppen (OPOE, OG, OTGP) ersetzt. Untersuchungen mit SDS als denaturierendem Agens erbrachten teilweise gute bis sehr gute Ergebnisse, in denen erstmalig bis zu 70% des gelösten Porins nach Beendigung der Rückfaltung in trimerisierter Form vorlag. Häufig wurde dafür denaturiertes Protein in etwa 1,5% SDS mitsamt den zu diesem Zeitpunkt ermittelten Hilfsstoffen (0,5% OPOE, 300 mM NaCl, 25 mM Phosphat-Puffer pH8,7) in den Dialysekammern vorgelegt und gegen identische Außenbedingungen ohne SDS dialysiert.

Die nachfolgende Aufreinigung bereitete allerdings wiederum große Probleme, die über die zur Verfügung stehenden Mittel nicht zu lösen schienen. Zudem war ein Detergenzmix aus SDS und den jeweiligen Zieldetergenzien zu unbestimmt, als dass hier definierte Bedingungen für die weiterführenden Experimente eingestellt werden konnten; weiterhin behinderte SDS die 2D- und 3D-Kristallisation von Proteinen, die für rückgefaltetes Omp32 geplant waren. Über 2D-Kristallisation mit anschließender Biomineralisation von Schwermetallen sollte das Niederschlagsverhalten und somit die teilweise spezifische Anlagerung von Schwermetallionen an Omp32 und davon abgeleitete Mutanten untersucht werden.

Rückfaltung/Trimerisierung über SDS, I

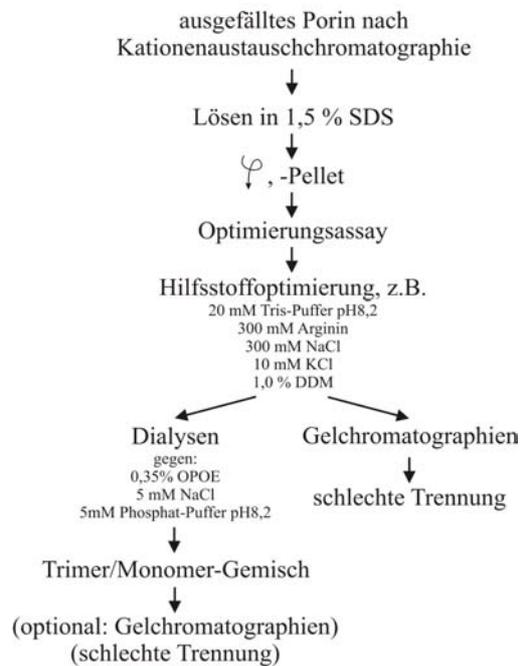


Abbildung 5.19: Flussschema zur Rückfaltung/Trimerisierung mittels SDS-denaturiertem Omp32

Um diesen Ergebnissen Rechnung zu tragen, wurde von Neuem ein denaturierendes System mit 8 M Harnstoff gewählt. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit hatte sich eine „Faustformel“ herausgeschält, nach der die Detergenkonzentration (angegeben in [%]) das Doppelte der Proteinkonzentration (angegeben in [mg/ml]) zu betragen hatte. Geringere Detergenkonzentrationen waren schlecht geeignet, das Protein in Lösung zu halten. Da die Ansätze häufig Proteinendkonzentrationen von 5-7 mg/ml enthielten, wurde dementsprechend viel Detergen zugesetzt, teilweise bis zu 10%, das nach der Rückfaltung durch Dialyse verringert werden konnte. Diese Verhältnisse korrelierten mit den Bedingungen, die bei der Isolation von nativem Omp32 aus *D. acidovorans* eingesetzt wurden. Unter diesen Voraussetzungen begannen die Rückfaltungen immer bessere Resultate zu erzielen, die jeweiligen FU stiegen an, zugleich fiel weniger Protein aus.

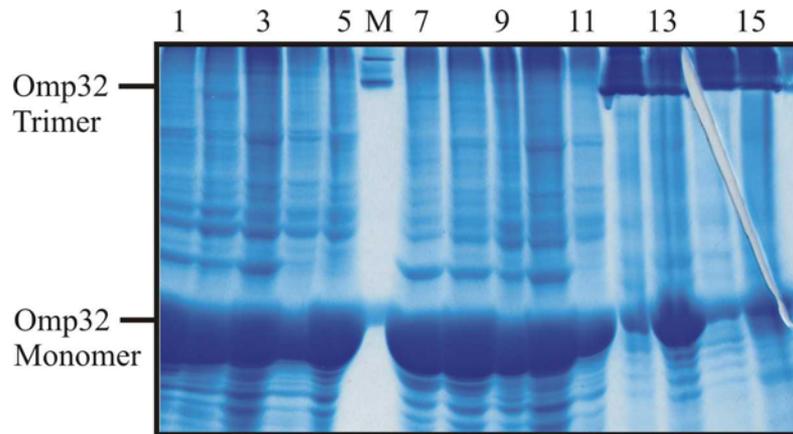


Abbildung 5.20: *Omp32-Derivate vor, unmittelbar nach und 14 Tage nach Beginn der jeweiligen Dialysen im präparativen Maßstab*

Banden 1-5: über Kationenaustauschchromatographie aufgereinigte Omp32-Derivate, 20 µl; Bande 6: Marker, natives Material gekocht/ungekocht, je 3 µl; Banden 7-11: Omp32-Derivate unmittelbar nach Beginn der Dialysen, 20 µl; Banden 12-16: Omp32-Derivate nach Beendigung der Dialysen nach 2 Wochen, 30 µl. Banden 1,7,12: rWT, 10 ml Dialysegefäß; Banden 2,8,13: Q4, 5 ml Dialysegefäß; Banden 3,9,14: 5Q, 5 ml Dialysegefäß; Banden 4,10,15: DE, 1 ml Dialysegefäß; Banden 5,11,16: Q1, 1 ml Dialysegefäß. Die einzelnen Lösungen wiesen einen nur geringen Reinheitsgrad auf. Nach dem sehr langen Dialysezeitraum von 2 Wochen lag in allen Ansätzen ein gut sichtbarer Anteil an Trimeren vor, jedoch wies keiner eine vollständige Trimerisierung auf. Die so erhaltenen Proben mussten weiter über Gelchromatographie aufgereinigt werden. Differenzen bzgl. der Proteinkonzentrationen entstanden durch Diffusion an monomerem Protein durch die Dialysemembran hindurch. Ein Niederschlag war in der hier vorliegenden Dialyse nur noch in sehr geringem Maße zu beobachten.

Bei dieser Methode stellte sich meistens ein Gemisch aus Trimeren/Monomeren ein, die über Größenausschlusschromatographie weiter aufgetrennt werden mussten. Dieser Schritt erwies sich als unüberwindbar, allerdings waren die Gelchromatographien, wie sich später herausstellte ungeeignet zur Separation der einzelnen Fraktionen.

Rückfaltung/Trimerisierung über Harnstoff, I

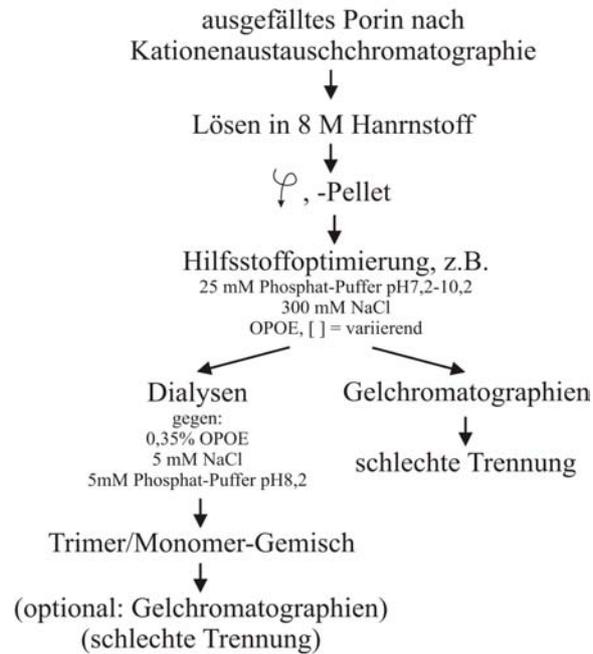


Abbildung 5.21: *Flussschema zur anfänglichen Rückfaltung/Trimerisierung mit Harnstoff*

Nach zahlreichen, langwierigen und meistens erfolglosen Optimierungsversuchen wurde eine Methode zur Reinigung und anschließenden vollständigen Trimerisierung gefunden. Dabei wurde Zwittergent3-14 als geeignetes Reinigungsdetergens entdeckt und somit ein Weg gefunden, die bislang unvermeidliche Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie zu umgehen. Dafür wurden wiederum mehrere Versuchsserien durchgeführt, die die Denaturierungsbedingungen, die Reihenfolge der Zugabe an Hilfsstoffen, Inkubationstemperaturen und nochmals die Konzentrationen an Hilfsstoffen optimierten.

Die Proteine wurden dabei wesentlich schonender behandelt als über die lange Verweildauer in 8 M Harnstoff, was sich im weiteren Verlauf als wichtig erwies. Zudem gab es keinerlei Verluste an Omp32 und mehrere Mutantenspezies konnten gleichzeitig behandelt werden. Ein entscheidender Fortschritt gelang durch die Herabsenkung der Proteinendkonzentration in Rückfaltungsansätzen auf 0,5-1,0 mg/ml und durch Inkubation des Rückfaltungsansatzes für längere Zeit bei erhöhter Temperatur. Die aktuelle erfolgreiche Methode zur Rückfaltung benutzte die im Folgenden aufgelisteten Bedingungen:

Endkonzentrationen	Chemikalien, Stammlösungen
2mg/ml rechnerisch	Omp32-Spezies in 8 M Harnstoff , [] = variierend
0,3/0,3/0,8% (OG/OPOE/OTGP)	20% Detergens (OG/OPOE/OTGP)
1 M	2 M Arginin pH8,0
25 mM	1 M Tris pH8,0
50 mM	1 M NaCl
1 mM	100 mM CaCl ₂

Der Ansatz wurde in exakt obiger Reihenfolge pipettiert, nach jeder Zugabe kurz durchmischt und nach Fertigstellung sofort für einen bis zehn Tage bei 55°C unter starkem Schütteln inkubiert. Es ergaben sich einige Punkte, die sich als wichtig erwiesen:

- Von Zellernte bis zum fertigen Rückfaltungsansatz dürfen nicht mehr als 2 Tage vergehen;
- Die Reihenfolge der zugegebenen Hilfsstoffe schien Einfluss zu haben und durfte nicht verändert werden;
- Das Porin musste so kurz wie möglich in frischem 8 M Harnstoff gelagert werden;
- Die Rückfaltung erfolgte spontan und war in kürzester Zeit beendet;
- Der Effekt der Detergenzien konnte stark variieren und nicht vorhergesagt werden;
- Das Volumen des Ansatzes sollte 80% des Reaktionsgefäßes ausmachen, um Konzentrationsschwankungen durch spätere Kondensbildung und eine damit einhergehende Ausbildung einer Phasenschichtung weitgehend zu vermeiden.

Erfolgreiche Ansätze zeigen so gut wie keinen Niederschlag mehr, was sehr wahrscheinlich auch auf die verringerte Proteinkonzentration zurückzuführen war. Hinzu kam, dass Omp32 aus den Inclusion-Bodies mit 8 M Harnstoff in drei Ansätzen bei unterschiedlichen Temperaturen extrahiert wurde. Bereits die so gelösten Proteine wiesen Unterschiede bei ansonsten identischen Rückfaltungsbedingungen auf, die einzeln untersucht werden mussten, um die Trimerisierung zu optimieren. Experimente mit einer Omp32-Spezies führten deswegen immer zu einem 3x3-Assay, in dem die beiden Parametern „Detergensart“ und „Lösungstemperatur von Omp32 in 8 M Harnstoff“ getestet werden mussten.

Rückfaltung/Trimerisierung über Harnstoff, II



Abbildung 5.22: Flussschema zur Rückfaltung/Trimerisierung mit Harnstoff-denaturiertem Omp32

5.1.6 Trimerisierung

Um vergleichbare Ergebnisse, insbesondere bei Leitfähigkeitsmessungen und 2D-Kristallisation zu erhalten, mussten die verschiedenen Mutanten einheitlich vorliegen. Dabei sollte als Endform eine vollständige Trimerisierung der Porine erzielt werden, da dies auch der Zustand des aus *D. acidovorans* aufgereinigten nativen Omp32 ist.

Einige der ersten Versuche zur Rückfaltung verliefen insofern erfolgsversprechend, als hier bereits Anteile von trimerisierten Omp32 sichtbar wurden, die allerdings im Vergleich zur Monomer-Bande in SDS-PAGE nur sehr gering ausfielen. Abhilfe sollte in solchen Fällen eine anschließend durchgeführte Gelfiltration schaffen, in der die enthaltenen Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Diese Ansätze führten durchweg zum Scheitern, da im Großteil aller Fälle eine Durchmischung der verschiedenen Omp32-Multimere zu beobachten war. Entgegen der erwarteten Reihenfolge Trimer-Monomer verhielten sich alle Läufe entgegengesetzt, da ein Teil der Monomeren immer vor den Trimeren eluierte.

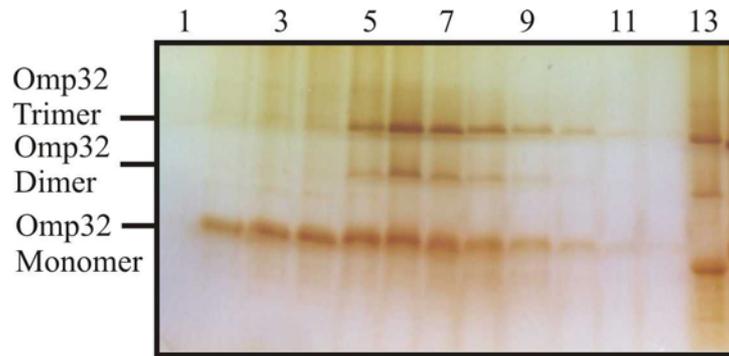


Abbildung 5.23: Gelchromatographie mit Superdex200 von Dodecylmaltosid-rückgefaltetem rWT im analytischen Maßstab

Linke Fraktionen haben höhere theoretische Molekulargewichte als rechte Fraktionen. Omp32-Derivate, die DDM als Zieldetergens während der Rückfaltung erhalten, zeigen sehr häufig neben der erwünschten Trimerisierung eine zusätzliche Bande auf Dimerhöhe. In dieser SDS-PAGE wie auch bei allen anderen, die zur Analyse der einzelnen Fraktionen einer Gelchromatographie verwendet werden, verteilen sich die Monomere des ursprünglich eingesetzten Materials (Bande 13) über nahezu die gesamte Chromatographie. Die Ursache hierfür sind wahrscheinlich Aggregate aus fehlgefalteten Monomeren in unterschiedlichen Größen, die deswegen in den einzelnen Fraktionen zu finden sind. Diese Aggregate zerfallen im Gegensatz zu korrekt gefalteten Trimeren und Dimeren unter dem denaturierenden Einfluss der SDS-PAGE und sind deswegen nur als Monomere sichtbar. Eine Trennung zwischen Trimeren und Dimeren ist ebenfalls nicht im erhofften Maß möglich, obwohl die Trennleistung der Säule laut Herstellerangaben dazu in der Lage sein sollte. Eine weitere Aufreinigung von Trimeren über dieses System ist somit nicht möglich.

Offensichtlich aggregierten die Monomere und bildeten so höhermolekulare Komplexe, die unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE nicht als Komplexe, sondern nur als Monomere erkennbar waren. Dieses Verhalten wurde unter allen getesteten Parametern beobachtet. Die Veränderung von Parametern wie Salzkonzentration, Detergenskonzentration, CaCl_2 -Konzentration oder Harnstoffkonzentration hatte keinen positiven Einfluss auf das Laufverhalten der Gelchromatographie. In wenigen, besonders drastischen Fällen konnte der Zerfall von bereits trimerisierten Omp32 während der Gelfiltration nachgewiesen werden, sodass letztlich der jeweilige Ansatz vollständig verloren war.

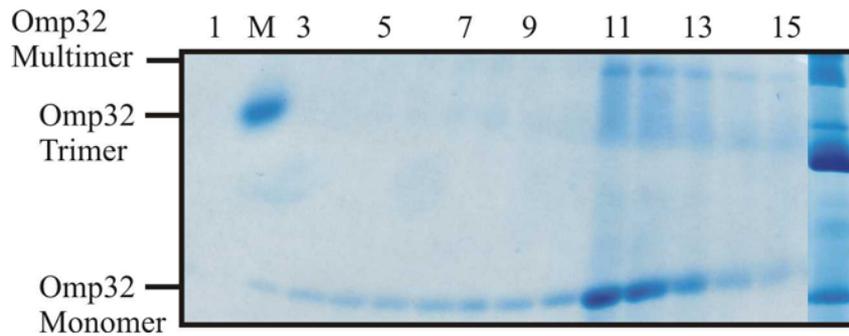


Abbildung 5.24: Gelchromatographie von Omp32-Q1 im präparativen Maßstab

Linke Fraktionen hatten höhere theoretische Molekulargewichte als rechte Fraktionen. Q1 wurde vorher gegen eine niedrige Endkonzentration von 0,3 % OPOE dialysiert. Das dabei erhaltene Material ist in Bande 16 zu sehen und beinhaltet einen hohen Trimeranteil (starke mittlere Bande) im Gegensatz zum Monomer. Ebenfalls enthalten sind höhermolekulare Proteine bzw. Aggregate, hier bezeichnet als Omp32-Multimere. Bei dieser speziellen Chromatographie zerfielen die enthaltenen Trimere nahezu vollständig in Monomere, die wie in anderen Gelchromatographien über die Gesamtheit aller Fraktionen eluieren. Zusätzlich zum Fehlschlagen des Reinigungseffektes über eine Größentrennung kam in einigen wenigen Chromatographien diese fast vollständige Monomerisierung der aufgetragenen Proben zum Tragen. Das Protein ging in diesen Versuchen quantitativ verloren. M bezeichnet nativ aufgereinigtes trimeres Omp32 als Größenmarker.

Dies führte zu der Erkenntnis, dass offensichtlich die getesteten Bedingungen während der Gelchromatographie zu weit von möglichen optimalen Parametern entfernt lagen. Da für alle nachfolgenden Versuche ausschließlich Omp32-Trimere vorliegen sollten, musste die Gelchromatographie als Reinigungsschritt vermieden werden. Dies gelang, indem die Rückfaltung von Omp32 so ausgearbeitet wurde, dass nach der Rückfaltung das Porin bereits vollständig trimerisiert vorlag.

Ein wichtiger Schritt hierzu war die Benutzung von Zwittergent3-14, sodass auf eine Aufreinigung über 8 M Harnstoff verzichtet werden konnte. Reine Trimerisierungen mit diesem Material erwiesen sich zum Ende der Arbeit hin als möglich, wobei die unter [5.1.5.] genannten Punkte unbedingt einzuhalten waren. Weiterhin stellte sich heraus, dass in Rückfaltungsansätzen, die für zwei bis zehn Tage bei 55°C inkubierten, der Anteil an trimerisiertem Protein kontinuierlich anstieg, was jeweils über SDS-PAGE nachgeprüft wurde und für alle derartigen Ansätze überprüft werden sollte.

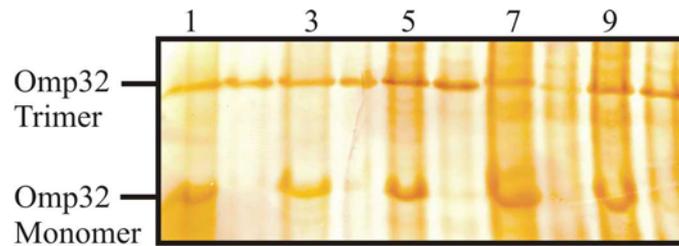


Abbildung 5.25: vollständige Trimerisierungen von Omp32-Derivaten nach Rückfaltung von Detergens-aufgereinigten Proteinen im analytischem Maßstab

Banden 1,3,5,7,9: Omp32-Derivate 24 h nach Beginn der Rückfaltung bei RT; Banden 2,4,6,8,10: Omp32-Derivate, nach zusätzlicher Inkubation für 60h bei 42°C unter Schütteln. Banden 1,2: rWT; Banden 3,4: Q1; Banden 5,6: Q2; Banden 7,8: DE; Banden 9,10: 5Q. Jeweils 30 µl. Auffallend war, dass die Trimerbande nach längerer Inkubation nicht stärker wurde, sondern die Monomerbande verschwand und dies den Reinigungseffekt bewirkte. Dies konnte auf eine Aggregation der Monomere zurückgeführt werden, die durch Zentrifugation für 15 min bei 20.000 g vollständig entfernt wurden. Die einen Tag nach Beginn der Rückfaltung genommenen Proben wurden unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert.

Es konnte hierbei zu erhöhtem Niederschlag an Protein kommen, der vermutlich von aggregiertem monomeren Omp32 stammte. Unter den Bedingungen, die die beste Methode innerhalb der Arbeit darstellte, ergab sich meistens ein relativer Anteil von 50-70% Trimeren.

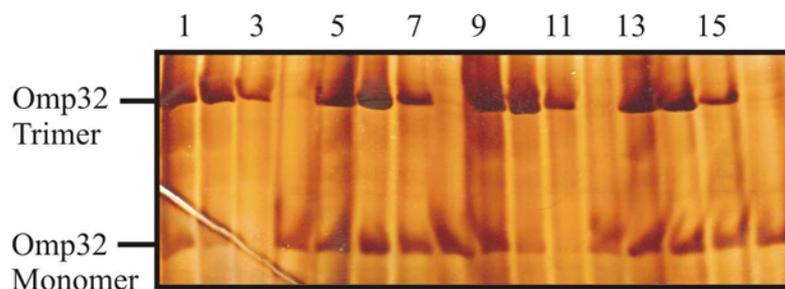


Abbildung 5.26: Trimerisierungsansätze von Detergens-aufgereinigten Omp32-Derivaten

Banden 1-4: Rückfaltungsansätze mit 1 M Arginin, pH9,5; Banden 5-8: Rückfaltungsansätze mit 0,5 M Arginin, pH9,5; Banden 9-12: Rückfaltungsansätze mit 1 M Arginin, pH8,5; Rückfaltungsansätze 13-16: Rückfaltungsansätze mit 0,5 M Arginin, pH8,5. Banden 1,5,9,13: rWT; Banden 2,6,10,14: Q2; Banden 3,7,11,15: Q4; Banden 4,8,12,16: Q45. Die Proben mit höherer Arginin-Konzentration wiesen ein besseres Trimer/Monomer-Verhältnis auf. Eine Änderung von pH9,5 zu pH8,5 hatte hier keinen eindeutigen Effekt.

In einigen Experimenten konnte dieser Wert die erforderlichen 100% erreichen.

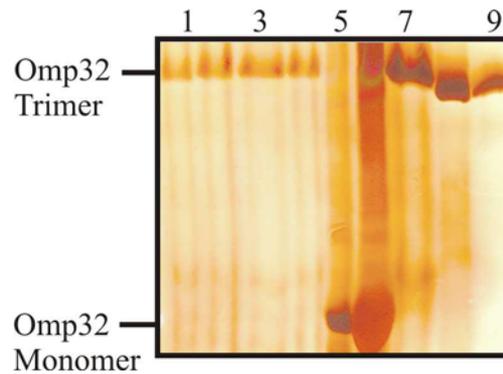


Abbildung 5.27: Nachweis der vollständigen Trimerisierung von mehreren präparativ zurückgefalteten Omp32-Derivaten

Banden 1-4: Versuche zur Reihenfolge der Hilfsstoff-Applikation, analytischer Maßstab; Banden 5,6: Aufreinigung Q1, siehe auch [Abbildung 5.11]; Bande 7: Q1; Bande 8: Q3; Bande 9: Q4. Jeweils 30 µl.

Die Gründe für die Variabilität der Ergebnisse sind nicht bekannt. Nach wie vor ist es nicht möglich, vorhersehbar Ansätze zu produzieren, die eine optimale Rückfaltung mit vollständiger Trimerisierung garantieren. Die Erfahrung zeigte jedoch, dass wiederholt durchgeführte Experimente gewünschte Ergebnisse liefern konnten.

5.1.7 Nachweis einer Malat-Bindung an Omp32

Unter der Annahme, dass Omp32 Malat und andere kleinere organische Säuren binden kann, wurde ein Bindungstest über ^{14}C -Malat durchgeführt. Aus ersten Versuchen mit niedrigeren Konzentrationen von Porin und radioaktivem Malat war bekannt, dass die Bindungskonstante, falls überhaupt mit den verwendeten Methoden nachweisbar, im millimolaren Bereich liegen würde. Die durchgeführte Versuche beinhalteten neben je 70.000 Bq ^{14}C -Malat:

- Membran: Puffersystem ohne Omp32 als Kontrolle. Hierüber konnte die Bindefähigkeit der Nitrozellulose-Membran bezüglich ^{14}C -Malat ermittelt werden.
- wWT: natives Omp32 ohne Modifikationen zur Bestimmung der Bindungskonstante von ^{14}C -Malat.
- wWT denat.: denaturiertes natives Omp32 zur Bestimmung der unspezifischen Bindung von ^{14}C -Malat an vollständig entfaltetes Porin.
- wWT Malat: natives Omp32 mit nicht-radioaktivem Malat, um die unspezifische Bindung von Malat an korrekt gefaltetem Omp32 bestimmen zu können.
- rWT: rekombinantes Omp32 ohne Modifikationen zur Überprüfung der Bindungskonstante von ^{14}C -Malat an nativ gefaltetem, rekombinantem Omp32. Das

Protein unterscheidet sich nur in der ersten Aminosäure von wWT. Es wurden identische Ergebnisse zu „wWT“ erwartet.

- rWT Malat: rekombinantes Omp32 mit nicht-radioaktivem Malat, um die unspezifische Bindung von Malat an nativ gefaltetem, rekombinatem Omp32 bestimmen zu können. Dies ermöglichte eine Überprüfung der Ergebnisse von „wWT Malat“, da identische Werte erwartet werden.

Jede Probe wurde dreimal für 10 min im Szintillationscounter vermessen. Die dabei auftretenden Schwankungen liegen immer unter 0,5%, sodass sie hier nicht als Fehlerbalken dargestellt werden. Die eingesetzte Radioaktivität von 70.000 Bq wurde durch die zweifache Behandlung mit Waschpuffer gut reduziert auf etwa 30 „counts“ pro Sekunde.

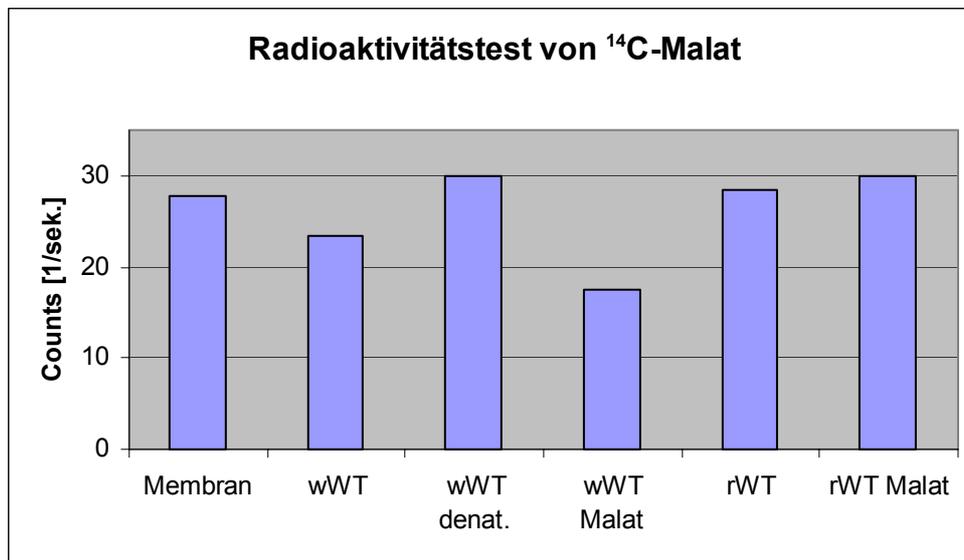


Abbildung 5.28: Messergebnisse aus dem Malat-Bindungstest

Die Messwerte deuteten nicht auf eine Bindung von Malat an Omp32 hin. Störend für eine mögliche Auswertung wirkte sich der sehr starke Hintergrund aus, der über den reinen Membran-Anteil vermessen worden war. Nichtradioaktives Malat senkte die an Omp32 gebundene Radioaktivität nicht wie erwartet deutlich ab, insbesondere im Messteil mit rWT. Denaturiertes Omp32 besaß nach wie vor eine hohe Bindekapazität für Malat. Es musste letztlich davon ausgegangen werden, dass die hier verwendete Versuchsanordnung nicht in der Lage war, eine mögliche Bindungsstelle für Malat im Inneren von Omp32 korrekt wiederzugeben.

Eine tiefere Auswertung der zugrundeliegenden Messwerte war nicht möglich. Es trat praktisch keinerlei Konsistenz innerhalb der Ergebnisse auf. Die reine Trägermembran aus Nitrozellulose band mehr Radioaktivität als Membran mit Porinen (wWT), denaturiertes Omp32 wies eine höhere Bindungsfähigkeit auf als natives Omp32, kaltes Malat hat bei wWT einen wie erwartet negativen Effekt, aber gleichzeitig leicht positive Auswirkung auf die

Bindung von radioaktivem Malat an rWT. Es wurde aus diesen Ergebnissen heraus nicht erwartet, dass durch zusätzliche Experimente mit dieser Methode die beinahe willkürlichen Messwerte sich vereinheitlichen und verbessern würden. Deshalb wurden keine weitere Untersuchungen in diese Richtung unternommen.

5.1.8 Leitfähigkeitsmessungen an Omp32

Als alternative Methode zum Nachweis der funktionellen Faltung des Porins und zur Untersuchung der Porineigenschaften wurden erste Leitfähigkeitsmessungen an sowohl nativem wie auch rekombinantem Porin unternommen. Gemessen wurde dabei der Ionenstrom von Na-Malat und KCl durch verschiedene, in Lipidmembranen eingebaute Porine.

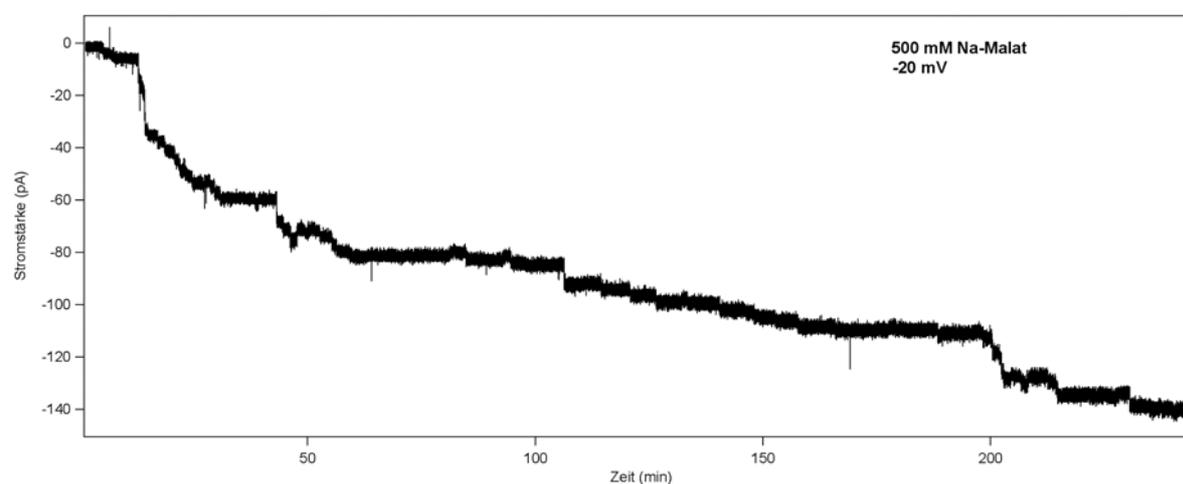


Abbildung 5.29: Leitfähigkeitsmessung von Omp32-rWT bei 500 mM Na-Malat

Bei Leitfähigkeitsmessungen treten charakteristische Stufen und Sprünge auf, die vom Einbau, von Schließ- und Öffnungsereignissen herrühren. Das rekombinante Protein zeigt eine für Omp32 charakteristische Zeit-Strom-Kurve. Die Breite der Messkurve stammt aus Rauschen, das sich aus zufälligem „noise“, sowie nicht auflösbaren Porenfluktuationen zusammensetzt. Aus einer solchen Messreihe kann die Leitfähigkeit des Porins unter den angegebenen Werten ermittelt werden.

Diese Messungen wurden für mehrere Omp32-Präparationen durchgeführt. Über eine Auswertung der beobachteten Stufenhöhen ließ sich eine Statistik für den rekombinanten Wildtyp erstellen. [Abbildung 5.30, Tabelle 5.5] Die Daten zeigen eine ähnliche Verteilung wie der nativ isolierte Wildtyp, bei dem weniger Öffnungs- und Schließprozesse ausgewertet werden konnten. Die charakteristischen Werte für die Leitfähigkeit des rekombinanten Omp32-WTs decken sich innerhalb der Messgenauigkeit gut mit den ermittelten Werten für natives Omp32-WT. Daraus sind zweierlei Schlüsse zu ziehen. Zunächst wurde damit gezeigt, dass das rekombinante Omp32 in einem funktionellen Zustand gefaltet vorliegt. Der Vergleich der durchschnittlichen Stromabstufungen für die Trimere lässt außerdem den

Schluss zu, dass sich isoliertes und rekombinantes Porin hinsichtlich der Porengröße und der Poreneigenschaften, die gemeinsam die Leitfähigkeit der Pore bestimmen, nicht unterscheiden. Man kann folglich davon ausgehen, dass das rekombinante Omp32 die natürliche Struktur und die daraus resultierenden Eigenschaften angenommen hat.

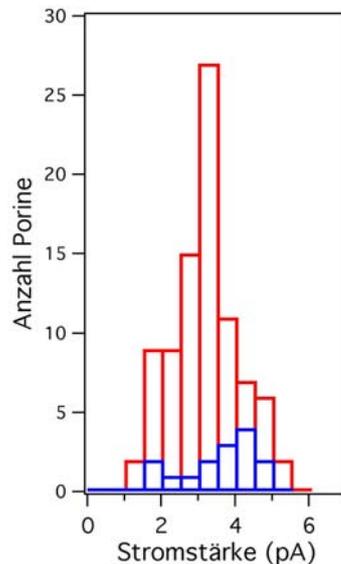


Abbildung 5.30: Histogramm der absoluten Häufigkeiten der Stromstufen für natives Omp32 (blau) und rekombinantes Omp32 (rot)

Tabelle 5.5: Ausgewertete Stufenhöhen unterschiedlicher Omp32-Präparationen

Omp32-Spezies	Öffnungs-Ereignisse	Durchschnittliche Stromstufe für ein Porintrimer [pA]	Standardabweichung [pA]
wWT (1)	gemittelt	3,8	0,9
wWT (2)	gemittelt	3,67 ⁴⁰	0,58 ⁴⁰
rWT	Einzel	3,0	1,2
	Doppel	3,4	0,3
	Trippel	3,6	0,8

Die Fähigkeit von rekombinantem Omp32, Malat als Substrat in der Pore zu binden, wurde durch die Messung einer Malat-Bindekinetik [Abbildung 5.31] untersucht. Da der durch die Poren fließende Ionenstrom nicht nur durch Malat-Ionen, sondern auch einen Beitrag von Na⁺-Ionen beinhaltet, wurden verschiedene Stromkurven im Vergleich betrachtet. Der Stromfluss durch eine virtuelle zylindrische Pore in einer K-Oxalat- bzw. KCl-Lösung zeigen einfaches, nahezu lineares Verhalten ohne Sättigungscharakteristik. Bei diesen Simulationen treten per Definition keine Interaktionen der passierenden Substanzen mit dem Kanal des

Zylinders auf, wobei als einziger Effekt die Auswirkung der Ionendrift in Abhängigkeit von der angelegten Spannung und der gewählten Ionenkonzentration beobachtet werden kann. Die entsprechenden Kurven steigen sehr steil an und liegen deutlich oberhalb von den jeweils dazugehörigen experimentell ermittelten Messkurven. Anstelle von Na-Malat wurde K-Oxalat für die Simulationen verwendet, da keine Daten für Na-Malat zur Verfügung standen.

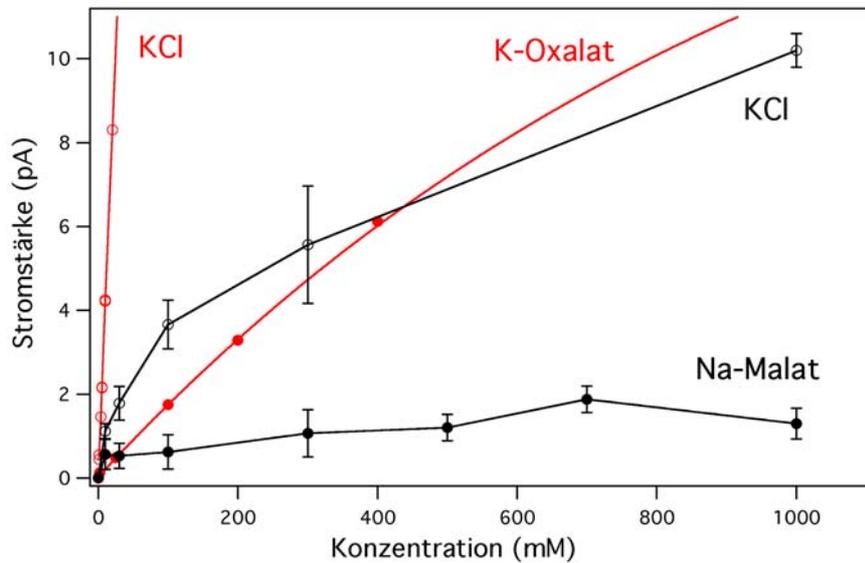


Abbildung 5.31: Theoretische und experimentell gemessene Durchgangskinetiken für KCl, Na-Malat und K-Oxalat durch Omp32

Die roten Kurven simulieren den Durchgang der Ionen durch eine Pore mit einer Länge von 5 nm und einem Querschnitt von $0,25 \text{ nm}^2$, was den Abmessungen der „constriction zone“ von Omp32 entspricht. Dabei treten keine elektrostatischen Wechselwirkungen der Ionen mit dem Kanal auf. K-Oxalat verhält sich sehr ähnlich wie Na-Malat und wird als Substitut für die nicht-berechnete Na-Malat Kurve verwendet. Die schwarzen experimentellen Kurven laufen deutlich unter den jeweiligen theoretischen Graphen. Na-Malat zeigt bereits bei sehr geringen Konzentrationen einen nahezu waagerechten Verlauf.

Da die experimentellen Daten wesentlich flacher verlaufen und ein deutliches Sättigungsverhalten zeigen, treten in Omp32 demzufolge Interaktionen zwischen dem Kanal und den Substraten auf, die die Diffusionsgeschwindigkeiten der Ionen reduzieren und auf eine Bindung von Ionen hinweisen. Besonders auffallend ist dieser Effekt der Interaktion mit Na-Malat. In den experimentellen Daten ergeben die dazugehörigen Messwerte bereits bei geringen Molaritäten einen beinahe konstanten Wert, ein Indiz für das Vorhandensein eines Maximums und damit eines sättigbaren Transportes. Dieser Effekt tritt nur dann auf, wenn das Substrat innerhalb des Kanals während der Passage gebunden wird, und diese Immobilisierung bei hohen Molaritäten der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Ein solches Verhalten wurde bereits aus Untersuchungen zur Elektrostatik des Porins abgeleitet, ein experimenteller Nachweis stand jedoch noch aus. Bei der experimentell gemessenen

Malat-Kinetik ist zu berücksichtigen, dass auch Na^+ -Ionen zur Leitfähigkeit beitragen, die aber nicht im Kanal gebunden werden können⁵². Berücksichtigt man einen solchen (quantitativ nicht bekannten) Beitrag mit einer Nicht-Sättigungs-Kinetik, so resultiert eine noch ausgeprägtere Sättigungskinetik für Malat-Ionen.

Für kleinere Anionen wie Cl^- ist ebenfalls eine Sättigungskinetik zu beobachten, die hier gemessenen Werte deuten aber auf eine deutlich schlechtere Bindung und somit niedrigere Spezifität hin. Dies stimmt mit Molekulardynamik-Simulationen zum Translokationsverhalten von Cl^- -Ionen überein.⁵² Die Kurve verläuft aus diesem Grund höher und mit späterer Sättigung als diejenige von Malat. Die Messwerte für Malat gehen als einzige sehr rasch in einen Sättigungsbereich über. Dieser Effekt tritt bei Molaritäten auf, die innerhalb der Messreihen unterrepräsentiert sind und so keinen sicheren Schluss auf die zugrunde liegende Bindungskonstanten zulassen. Es ist jedoch offensichtlich, dass die Halbsättigungskonstante im niedrigen millimolaren Bereich bei etwa 10 mM oder niedriger liegt.

5.2 PAP

5.2.1 Identifizierung der Gensequenz und der Primärstruktur

Die in der Röntgenstruktur von Omp32 sichtbaren acht Aminosäuren führten über eine Edman-Sequenzierung zur vollständigen Sequenz des co-kristallisierten PAP-Fragmentes.⁶⁴ Durch diese Information war es möglich, unter Berücksichtigung der eingeeengten „*codon usage*“ nach [4.3.1] degenerierte Primersätze zu konstruieren. In der ersten PCR mit diesen Primern wurde DNA mit einer Länge von etwa 120 bp amplifiziert, in der erstmalig ein Teil der genetischen Sequenz von PAP mit 84 bp entziffert werden konnte (Positionen 115-198).

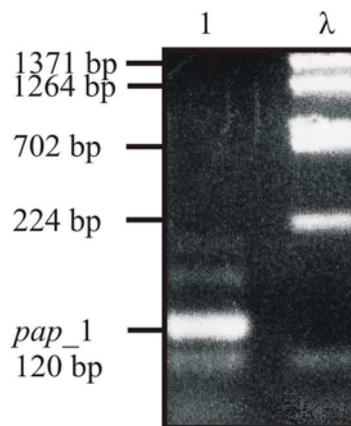


Abbildung 5.32: Erste PCR zur Generierung eines DNA-Stückes komplementär zur bekannten kurzen Aminosäuresequenz

Bande 1: degenerierte Primer ergaben wie erhofft sofort ein Fragment der erwarteten Größe. Das Haupt-PCR-Produkt wurde ausgeschnitten, in einen Klonierungsvektor ligiert und sequenziert. Ein Teil der erhaltenen Sequenz entsprach genomischer DNA-Information von PAP. Bande 2: Marker λ /BstEII.

In der dazugehörigen Versuchsreihe zeichnete sich früh ab, dass DMSO einen positiven Einfluss auf den Erfolg einer PCR ausübte. Die besten Ergebnisse ergaben sich bei DMSO-Anteilen von 5-10%. Weitere PCR-Versuche zu PAP wurden routinemäßig mit 3,5-10% DMSO durchgeführt.

Aufgrund eines GC-Gehaltes von 60% konnte die gesamte Gensequenz nicht mit einer einzigen Methode entschlüsselt werden, sondern erst durch die Verwendung von insgesamt vier unterschiedlichen Strategien. So wurde durch direkte Sequenzierung ausgehend vom Genom von *D. acidovorans* die identifizierte Sequenz bis zur Position 428 erweitert. Die dabei entstandenen Lücken mussten über konventionelle PCR geschlossen werden. Alternative Sequenzierungsversuche mit 10% DMSO anstelle von Betain, unter ansonsten

identischen Bedingungen, führten zu keinen guten Ergebnissen. Im nächsten Schritt wurde über den „Walker Kit“ [4.3.6] bis zur Position 649 sequenziert.

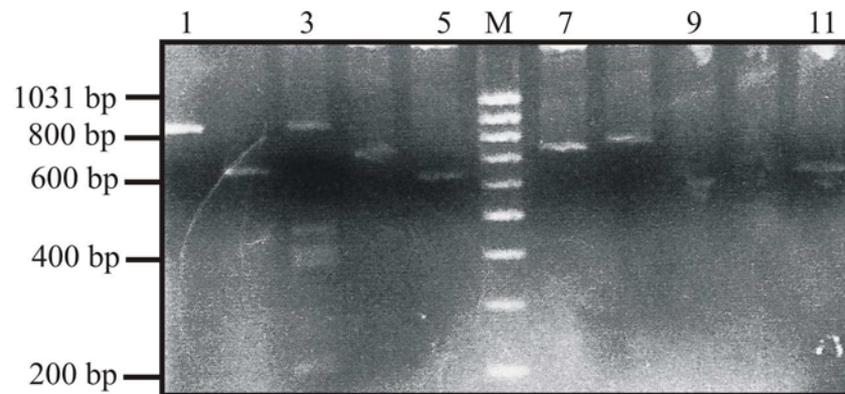


Abbildung 5.33: *PCR-Produkte aus der Walker-PCR der unterschiedlich verdauten genomischen DNA aus D. acidovorans*

Bande 1: ApaI; Bande 2: AlwNI; Bande 3: BglI; Bande 4: BstXI; Bande 5: Eco57I; Bande 6: 100 bp Marker; Bande 7: MluI; Bande 8: PstI; Bande 9: PvuI; Bande 10: SacI; Bande 11: StuI. Jeweils 10 µl nach Walker-PCR Runde 2. Nicht dargestellt sind KpnI, SacII, da diese keine Banden lieferten.

Dies wurde erst durch die Verwendung von 12 verschiedene Endonukleasen möglich, von denen drei Ansätze (MluI, PstI, StuI) bis dahin unbekannte Sequenzen erbrachten. Die letzten fehlenden Informationen, sowie zusätzliche 66 bp „*upstream*“, bzw. 98 bp „*downstream*“ der Gensequenz von PAP wurde durch die Verwendung von recyclierter genomischer DNA in einer PCR mit einem doppelten Satz an Primern in einer sogenannten „Nested PCR“ erlangt.

Als sehr hilfreich in allen verwendeten Schritten erwies sich dabei immer ein Abgleich der zuletzt gewonnen Informationen mit den bereits gelösten Gensequenzen von bekannten Proteinen, die auf Proteinebene eine hohe Ähnlichkeit mit PAP aufweisen. Dafür wurden in erster Linie die PAP-Homologen aus *Ralstonia solanacearum* sowie *Ralstonia metallidurans* verwendet.

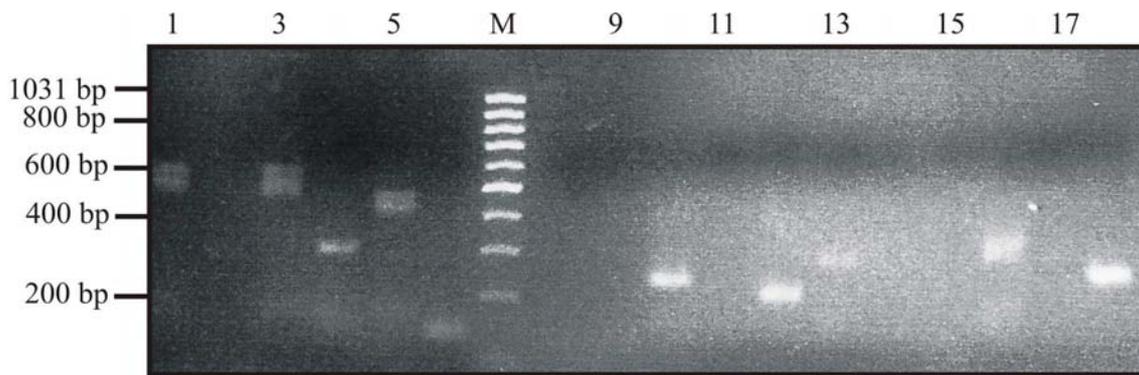


Abbildung 5.34: *Nested PCR von recyclichten genomischen DNA-Fragmenten aus D. acidovorans*

Banden 1,3,5,8,10,12,14,16,18: Nested PCR mit jeweils 3% DMSO; Banden 2,4,6,9,11,13,15,17 : Nested PCR mit jeweils 6,5% DMSO. Bande 7: 100 bp Marker. Bande 1: EcoRI; Banden 2,3: HindIII; Banden 4,5: KpnI; Banden 6,8: MluI; Banden 9,10: NcoI; Banden 11,12: NdeI; Banden 13,14: NotI; Banden 15,16: StuI; Banden 17,18: XbaI. Jeweils 10 μ l. Interessanterweise ergaben die DMSO-Unterschiede deutliche Veränderungen in den Längen der DNA-Fragmente der einzelnen Untergruppen, bzw. war nur in einem der beiden Ansätze ein Produkt vorhanden. Nach Anreicherung der Fragmente über Gelextraktion und Ligation mit einem Klonierungsvektor ergab ein HindIII-Produkt Zugang zu den fehlenden letzten Informationen.

Die somit gewonnene DNA-Information umfasst 825 bp. Auf die Gensequenz von PAP inklusive Stopcodon entfallen 660 bp, was einer Primärsequenz von 219 Aminosäuren entspricht. In der DNA-Information, die „downstream“ des Gens liegt, findet sich ein Transkriptionsstop, der über einen „stemloop“ mit einer Länge von 10 bp (680-689; 694-703) ausgebildet wird. Wie zu erwarten, findet sich ebenfalls eine Shine-Dalgarno-Sequenz „upstream“ von *omp32*. Die nicht für PAP codierenden DNA-Abschnitte können keinen weiteren Genen zugeordnet werden.

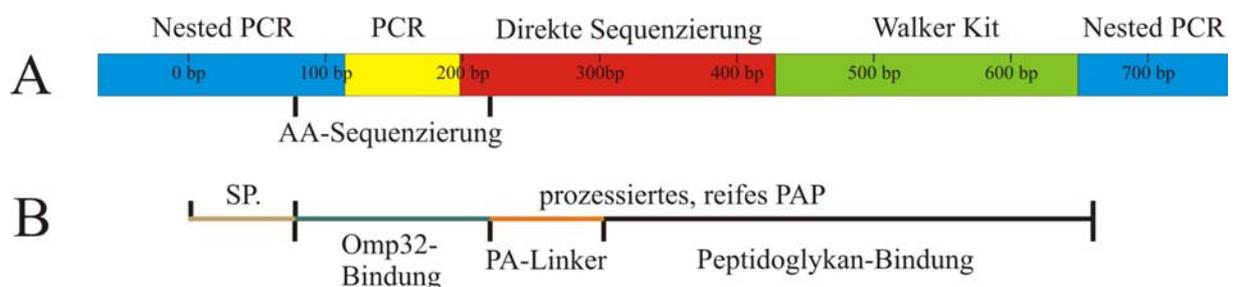


Abbildung 5.35: *Schema zur Sequenzierung von PAP und seiner Strukturelemente*

(A) Verwendete Methoden zur Generierung der genomischen Information für *pap*. Nach der Identifikation der Aminosäuresequenz des 51 AA langen Bruchstückes von PAP wurde in einer degenerierten PCR (gelb) die erste Sequenz identifiziert. Über die nachfolgenden Schritte - direkte Sequenzierung von genomischer DNA (rot), Walker Kit (grün) und Nested PCR von rezirkularisierter genomischer DNA (blau) - wurde die gesamte Sequenz mit Randbereichen von je etwa 60 bp aufgeklärt. (B) Unterteilung von PAP in seine identifizierten Domänen. SP.: Signalpeptid, 22 AA; Omp32 Bindung: AA 1-51; PA-Linker: AA 52-79, Peptidoglykan-Bindung: AA 80-197. Nähere Angaben im Text unter [5.2.2].

Tabelle 5.6: Gensequenz und abgeleitete Proteinsequenz von PAP aus *D. acidovorans*

```

GTGATGGTCACTGATAACGTCCACAGATTCGCAGCCCTGCTGCGGCTTTTTCCCCAAGAGGAGAACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      -60      -50      -40      -30      -20      -10      -1

ATGAAAGAAACTGAACAAAGTGGCGATGTTGTTTGCCTCTGCCGCCCTCGCAACGGCTGCTGGCGCACAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1      10      20      30      40      50      60      70
M K K L N K V A M L F A S A A L A T A A G A Q* V

TGAAGGCTGCTGACGGTGGCAAGACCATCGACAACCTGGCAAAACGGCACCAGCGAACTGGTGTGGAAGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
71      80      90      100     110     120     130     140
K A A D G G K T I D N W Q N G T S E L V W K N

CGGCACGAACGAACTGTGCTGGCGCGATGCCAACTGGACGCCCGCCACTGCAGCAGCTGACTGCGACGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
141     150     160     170     180     190     200     210
G T N E L C W R D A N W T P A T A A A D C D G

GCCCTGAAGCCTGTGGCAGCCGCTGTGGCTCCTGCCGCAACGCCCGCTCCGGCAGCTCCCGCTCCGGCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
211     220     230     240     250     260     270     280
A L K P V A A A V A P A A T P A P A A P A P A P

CGGCTCCCGCTCCGGCCGTGGCTTCCAAGGTGACCTTCTCTGCTGACGCTTTCTTCGACTTCGACAAGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
281     290     300     310     320     330     340     350
A P A P A V A S K V T F S A D A F F D F D K S

GGTTCTGAAGCCCGAAGGCAAGGCCAAGCTGGATGACCTGGCCTCCAAGGTCAAGGGCATCAACCTGGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
351     360     370     380     390     400     410     420
V L K P E G K A K L D D L A S K V K G I N L E

GTGGTCATCGCCGTCGGTCACACCGACTCCGTTGGCTCTGACGCCTACAACCAGAAGCTGTCGGTTCCGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
421     430     440     450     460     470     480     490
V V I A V G H T D S V G S D A Y N Q K L S V R R

GCGCTGAAGCTGTGAAGGCTTACCTGGTGTCCAAGGGCATCGAAAAGAACC GCGTCTACACTGAAGGCAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
491     500     510     520     530     540     550     560
A E A V K A Y L V S K G I E K N R V Y T E G K

GGGCGAAAAGCAGCCCATCGCCGACAACAAGACCAAGGAAGGCCGCGCAAAGAACC GTCGCGTGGAAATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
561     570     580     590     600     610     620     630
G E K Q P I A D N K T K E G R A K N R R V E I

GAAGTGGTCGGCACCCGCGCCGCTCAGTAATCTTTTCGATTGCTTCCCGCAAAAGCCCCGGCAACCGGGGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
631     640     650     660     670     680     690     700
E V V G T R A A Q *

TTTTTTATGGCCGAACGGTCGTCGCAATCACCGACAATCGAGCCATGAGCAACGCAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
701     710     720     730     740     750     760

```

Die dabei rot-markierten Abschnitte bezeichnen die Shine-Dalgarno-Sequenz, das Startcodon, sowie den identifizierten „*stemloop*“, der sehr wahrscheinlich als Transkriptionsstop dient. „Q*“ steht für pyro-Glutamat als die erste Aminosäure des prozessierten nativen PAP. Die 22 davor liegenden Aminosäuren stellen das Signalpeptid dar und werden beim Durchgang durch die innere Membran abgeschnitten. Die grün-markierte Sequenz „DNWQNGTS“ kennzeichnet die Aminosäuren, die als einzige in der Kristallstruktur von Omp32 [Abbildung 3.5] klar identifiziert wurden. Auf die 28 Aminosäuren lange blau-markierte Sequenz im Mittelteil von PAP wird im weiteren Text [5.2.2] noch eingegangen werden. Der unterstrichene Abschnitt markiert die Aminosäuren, die von der ersten Analyse durch die Proteinsequenzierung bekannt waren. Zu beachten ist dabei, dass die ursprünglich bekannte Sequenz Fehler enthielt [4.3.1].

Die „*codon usage*“ innerhalb PAP ist deutlich reduziert, wie bereits von den Proteinen Omp21 und Omp32 her zu erwarten war. Diese Eigenschaft wurde zur Bestimmung der ersten Teilsequenz genutzt. Von den insgesamt 61 Codons, die für Aminosäuren kodieren, werden nur 36 verwendet und selbst davon werden einige Codons nur in wenigen Fällen benutzt [Tabelle 5.7, Tabelle 5.8]. Die in Spalte „% PAP“ [Tabelle 5.8] angegebenen Zahlen beziehen sich auf das bereits prozessierte PAP und entstammen somit der um das Leaderpeptid bereinigten Sequenz. Die in der Spalte „ ϵ zu *E.c.*“ aufgelisteten Werte geben den Unterschied an zwischen der prozentualen Verwendung des jeweiligen Codons in PAP aus *D. acidovorans* und seiner prozentualen Verwendung im Genom von *E. coli*. Schwarze Zahlen bedeuten dabei eine erhöhte prozentuale Verwendung in PAP von *D. acidovorans*, rot-markierte negative Zahlen eine höhere Verwendung im Genom von *E. coli*. Zur Verwendung der einzelnen Nukleotide in den jeweiligen Positionen der Triplets [Abbildung 5.36] ist auffallend, dass Guanin und Cytosin an den Positionen 1 und 3 vorherrschen, an Position 2 jedoch ein insgesamt ausgewogenes Verhältnis von A+T/G+C vorliegt.

Tabelle 5.7: „codon usage“ von PAP und seinem Leaderpeptid

Trpl.	AA	fP	SP.												
AAA	K	1	1	ACA	T			AGA	R			ATA	I		
AAG	K	19	2	ACG	T	3	1	AGG	R			ATG	M		2
AAC	N	10	1	ACC	T	6		AGC	S	1		ATC	I	6	
AAT	N			ACT	T	2		AGT	S			ATT	I		
CAA	Q	2		CCA	P			CGA	R			CTA	L		
CAG	Q	3		CCG	P	4		CGG	R			CTG	L	9	1
CAC	H	1		CCC	P	6		CGC	R	7		CTC	L		1
CAT	H			CCT	P	2		CGT	R	1		CTT	L		
GAA	E	11		GCA	A	7	2	GGA	G			GTA	V		
GAG	E			GCG	A		1	GGG	G			GTG	V	12	1
GAC	D	11		GCC	A	12	3	GGC	G	11	1	GTC	V	4	
GAT	D	2		GCT	A	17	2	GGT	G	3		GTT	V	3	
TAA	*	1		TCA	S			TGA	*			TTA	L		
TAG	*			TCG	S	2		TGG	W	4		TTG	L		1
TAC	Y	3		TCC	S	4		TGC	C	2		TTC	F	4	
TAT	Y			TCT	S	2	1	TGT	C			TTT	F		1

Die Gesamtlänge des unprozessierten Proteins entspricht der Summe aller angegebenen Aminosäuren. Die Aminosäuren in der Spalte „fP“ beziehen sich auf das fertig gereifte PAP, diejenigen in der Spalte „SP“ allein auf das Signalpeptid unmittelbar nach Translation des Proteins.

Tabelle 5.8: Prozentuale „codon usage“ von PAP und Vergleich mit gesamter CU von *E. coli*

Trpl.	AA	% PAP	€ zu <i>E.c.</i>	Trpl.	AA	% PAP	€ zu <i>E.c.</i>	Trpl.	AA	% PAP	€ zu <i>E.c.</i>	Trpl.	AA	% PAP	€ zu <i>E.c.</i>
AAA	K	5	-71	ACA	T		-12	AGA	R		-4	ATA	I		-7
AAG	K	95	71	ACG	T	27	4	AGG	R		-3	ATG	M		0
AAC	N	100	39	ACC	T	55	12	AGC	S	11	-16	ATC	I	100	54
AAT	N		-39	ACT	T	18	-3	AGT	S		-13	ATT	I		-47
CAA	Q	40	9	CCA	P		-20	CGA	R		-5	CTA	L		-3
CAG	Q	60	-9	CCG	P	33	-22	CGG	R		-8	CTG	L	100	45
CAC	H	100	52	CCC	P	50	40	CGC	R	88	51	CTC	L		-10
CAT	H		-52	CCT	P	17	1	CGT	R	13	-30	CTT	L		-10
GAA	E	100	30	GCA	A	19	-3	GGA	G		-9	GTA	V		-17
GAG	E		-30	GCG	A		-34	GGG	G		-13	GTG	V	63	29
GAC	D	85	44	GCC	A	33	8	GGC	G	79	39	GTC	V	21	1
GAT	D	15	-44	GCT	A	47	28	GGT	G	21	-17	GTT	V	16	-13
TAA	*	100	38	TCA	S		-12	TGA	*		-30	TTA	L		-11
TAG	*		-9	TCG	S	22	9	TGG	W	100	0	TTG	L		-11
TAC	Y	100	53	TCC	S	44	27	TGC	C	100	43	TTC	F	100	51
TAT	Y		-53	TCT	S	22	3	TGT	C		-43	TTT	F		-51

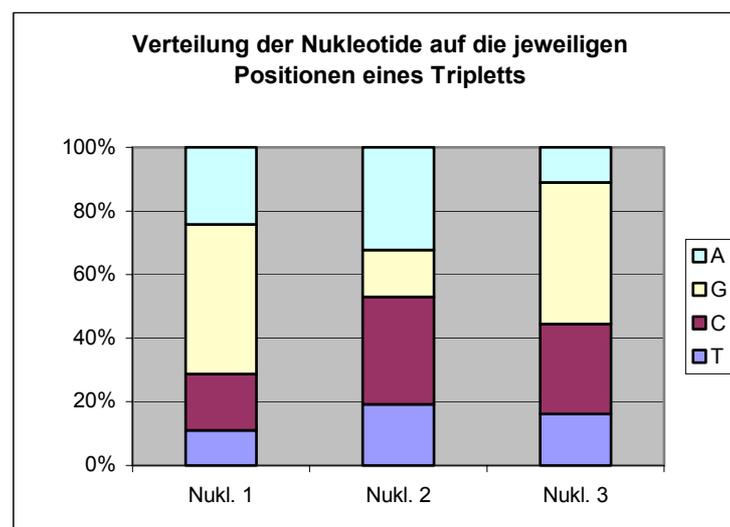


Abbildung 5.36: Verwendung der einzelnen Nukleotide in PAP-codierenden Triplets

Auffallend war die extreme Bevorzugung von Guanosin in den Nukleotidpositionen 1 und 3 mit jeweils mehr als 40% und eine Unterrepräsentierung in Position 2, mit nur etwa 15%. Aus welchem Grund die unterschiedliche Besetzung der Triplettpositionen in *D. acidovorans* erfolgt ist nicht bekannt.

5.2.2 Identifizierung der 3D-Struktur

Eine kürzlich erschienene Publikation⁸² lieferte klare Anhaltspunkte für die zu erwartende Struktur einer Domäne von PAP aus *D. acidovorans*. Zudem war aus der Kristallstruktur von Omp32 bekannt, dass ein Teil von PAP an Omp32 bindet. PAP konnte somit in zwei große Domänen unterteilt werden, die durch eine Art „bewegliche Kette“, nämlich die in der obigen Aminosäuresequenz [Tabelle 5.6] blau dargestellten Aminosäuren verbunden sind.

Nach Abspaltung des Leaderpeptids mit den ersten 22 Aminosäuren, das für die Membrangängigkeit von PAP codiert, entsteht das gereifte Protein mit einer Gesamtlänge von 197 Aminosäuren. Die erste Aminosäure ist ein pyro-Glutamat, was bereits aus ersten Proteinsequenzierungen her bekannt war.⁶⁴ Die ersten 51 Aminosäuren des prozessierten PAP weisen einen IEP von 4,4 auf, dies ist auch die Domäne, die nachweislich an die periplasmatische Seite von Omp32 bindet (acht grün markierten Aminosäuren in der obigen Sequenz). Eine Strukturvorhersage zur dieser Region mit Ihren 51 Aminosäuren war mit den verwendeten Internet-basierten Vorhersageprogrammen nicht möglich.

Die Unterdomäne von PAP, die aus beinahe ausschließlich drei verschiedenen Aminosäuren (P,A,V) eine 28 Aminosäuren lange Sequenz generiert, konnte ebenfalls nicht dargestellt werden. Allen Erwartungen zufolge ist das Hauptcharakteristikum dieses Abschnittes, dass er eine sehr hohe Flexibilität und mechanische Freiheitsgrade in mehreren Moden aufweist. (Persönliche Kommunikationen H. Engelhardt). Aus diesem Grund ist eine Strukturvorhersage für diesen Abschnitt mit den bisher gegebenen Methoden unmöglich.

Die letzte Domäne weist im Gegensatz zur Ersten einen deutlich basischen IEP von 9,6 auf. Aufgrund von Homologieuntersuchungen dieser Sequenz und einigen bekannten Funktionen stark homologer Bereiche, insbesondere des Proteins RmpM aus *Neisseria meningitides*,⁸² konnte davon ausgegangen werden, dass sie eine Bindungsstelle zur Peptidoglykan-Schicht des Bakteriums aufweist. Diese Domäne konnte als einziger Bereich von PAP strukturell vorhergesagt werden. Dafür wurden die Sequenzen von PAP, des PAP-Homologon aus *Ralstonia solanaceareum* als auch diejenige für RmpM von *N. meningitides* mit Hilfe der unter [4.9.2] genannten Programme analysiert.

Anwendung auf RmpM aus *Neisseria meningitides*: Dabei gelang es, über diese Programme die bereits über Röntgenstruktur gelöste Domäne von RmpM [Abbildung 5.37]

korrekt vorherzusagen. Die wesentlichen Bestandteile dieses Modells sind vier anti-parallele β -Stränge, zwei im etwa 120° Winkel zueinander stehende große α -Helices (α_2 , α_3) sowie ein größerer Loop, der zwei über eine zusätzliche Cystein-Brücke verbundene kleinere α -Helices (α_4 , α_5) aufweist. [Abbildung 5.37, links]

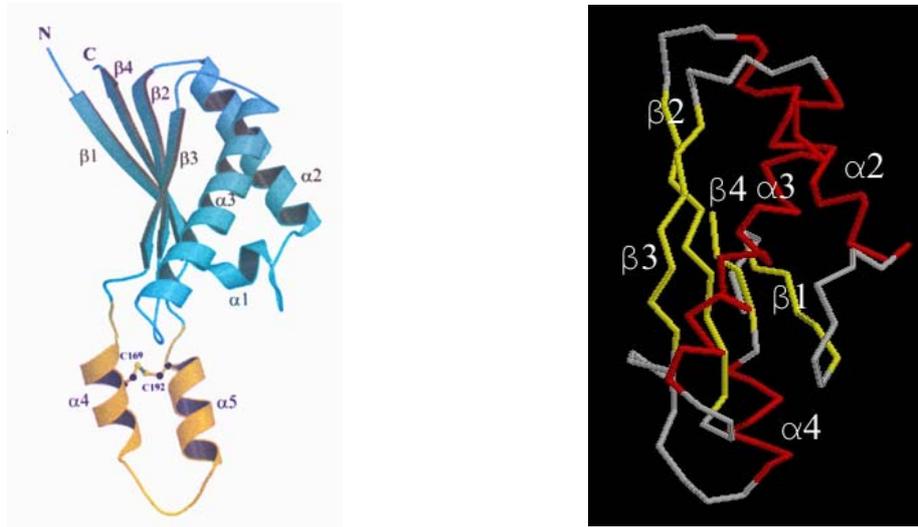


Abbildung 5.37: 3D-Strukturmodell von *RmpM* aus *N. meningitidis*, Vorhersage durch *ESyPred*

Die linke Struktur wurde auf der Grundlage der gelösten Kristallstruktur des Proteins *RmpM* erstellt.⁸² Die Seitenreste der Aminosäuren in der Vorhersage auf der rechten Seite wurden ausgespart. In gelb sind die $C\alpha$ -Atome des Proteins markiert, die als β -Faltblatt identifiziert wurden, in rot die $C\alpha$ -Atome, die eine α -Helix bilden. Die Nummerierung im rechten Bild ist an diejenige im linken angelehnt: α_3 [, α_4 [, α_2]; β_3 :., β_2 :., β_4 [, β_2 :.. Die Pfeile geben die Laufrichtung der jeweiligen Sekundärstruktur in der Strukturvorhersage von N- nach C-Terminus. α_4 weicht von Schema im linken Bild ab, siehe Text.

Die Strukturvorhersagen durch die drei verwendeten Programme für *RmpM* bildeten alle diese Eigenschaften bis auf geringe Unterschiede korrekt ab. Die dadurch erhaltenen Strukturen ähneln einander sehr stark und unterscheiden sich in erster Linie nur geringfügig durch die Anzahl der dargestellten β -Stränge, sowie durch die Modellierung der N-, sowie C-terminalen Aminosäuren. Hinzu kommen geringe Unterschiede im Übergang der α -Helix zum längsten β -Strang, sowie Konformationsunterschiede im untersten Loop mit der darin enthaltenen α -Helix [Abbildung 5.38]. Es wird deswegen im Weiteren nur auf das vollständigste, durch *ESyPred* generierte Modell eingegangen, da alle daraus abgeleiteten Aussagen ebenfalls für die beiden anderen Modelle zutreffend sind.

Als Unterschied zur gelösten Struktur stach in erster Linie der in den Vorhersagen deutlich verkleinerte Loop ins Auge, der nur eine einzige α -Helix (α_4) aufweist, die auch innerhalb der Kristallstruktur von *RmpM* dargestellt ist, allerdings an anderer Stelle und in

entgegengesetzter Orientierung. Daran angeschlossen ist der N-terminale β -Strang im Strukturmodell, der hier ebenfalls als $\beta 4$ identifiziert wurde. In der Kristallstruktur ist dieser Loop wesentlich größer und deutlich abgesetzt und enthält die beiden α -Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ und erst danach folgend $\alpha 4$. Dieser letzte β -Strang wurde in den Modellen falsch vorhergesagt, da die eigentliche Kehre des Loops bereits als β -Strang dargestellt wird und $\alpha 5$ nicht identifiziert und dargestellt werden konnte. Ein zusätzliches Indiz dafür ist, dass von allen Programmen nur ein Cystin (C169) modelliert wurde und sich dieses innerhalb des falsch vorhergesagten untersten Loops befindet, unmittelbar vor $\alpha 4$. Es hat dabei keine Möglichkeit zur Ausbildung einer Cysteinbrücke. Korrekt wäre die Vorhersage, wenn diese letzte α -Helix nach unten gebogen wäre, dadurch die deutlichere Hervorhebung des Loops entstünde und anschließend über eine weitere α -Helix wieder zurück an den Kernbereich des Proteins geführt werden würde. In allen anderen Bereichen aber spiegelte die Modellstruktur sehr gut die Kristallstruktur von RmpM wieder.

Eine Verwendung der dabei benutzten Programme zur Vorhersage einer bereits gelösten Struktur des PAP-homologen RmpM führte zu Ergebnissen, die die Kristallstruktur in vielen Punkten korrekt wiedergab. Diese Programme wurden deshalb auch für die Berechnung von Strukturmodellen für PAP eingesetzt.

Die dargestellten Strukturen in [Abbildung 5.38] repräsentieren die Ergebnisse der drei Programme bezüglich RmpM. In der [Tabelle 5.9] werden alle Start- und Endpunkte der daraus vorhergesagten strukturellen Sekundärelemente aufgelistet, wobei Unterschiede durch eine rote Markierung hervorgehoben sind. Es kann nicht festgestellt werden, welche Aminosäuren in der tatsächlich gelösten Kristallstruktur die Endpunkte dieser einzelnen Sekundärstrukturen darstellen, da diese Daten noch nicht für die Öffentlichkeit freigegeben worden sind.

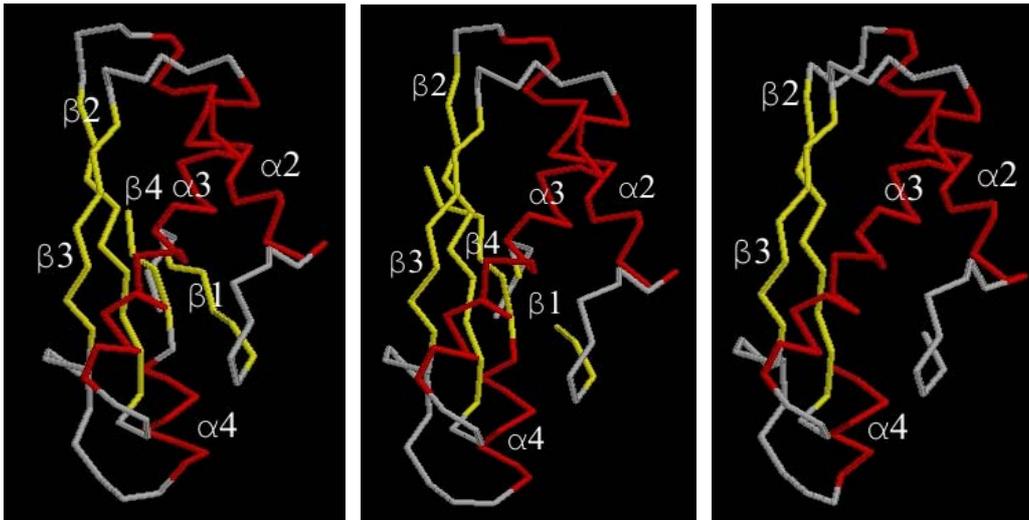


Abbildung 5.38: 3D-Strukturvorhersagen von RmpM.

Strukturvorhersagen generiert durch EsyPred3D, 3Dpssm und 3Djigsaw (von links nach rechts). Der N-Terminus beginnt oberhalb von $\beta 1$, der C-Terminus endet oberhalb von $\beta 4$. Alle Vorhersagen weisen mit nur wenigen Unterschieden ein identisches Faltungsmuster auf, dass demjenigen der Domäne aus der bekannten Kristallstruktur [Abbildung 5.37] entspricht.

Tabelle 5.9: Klassifikation der vorhergesagten Sekundärstrukturen von RmpM

Element	EsyPred3D	3Dpssm	3Djigsaw
Modellierte Sequenz	74-180	75-181	81-174
∇ -Helix 1	90-105	90-105	90-105
∇ -Helix 2	123-144	123-144	123-144
∇ -Helix 3	168-175	168-175	168-174
\exists -Strang 1	78-82	79-82	
\exists -Strang 2	110-118	109-118	110-118
\exists -Strang 3	151-157	151-157	151-157
\exists -Strang 4	177-180	176-181	

Anwendung auf PAP aus *D. acidovorans*: Die drei verwendeten Programme kamen zu beinahe identischen Ergebnissen [Abbildung 5.39]. Die Hauptunterschiede innerhalb der Vorhersagen von PAP durch die einzelnen Programme lagen wieder in der Anzahl der erkannten β -Strängen, der Länge der modellierten N- und C-Termini, sowie in der Ausbildung des untersten Loops.

Diese Strukturmodelle von PAP ähneln auf nahezu exakte Weise denjenigen, die für RmpM erstellt worden sind. Eine Ursache hierfür ist die hohe Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen im modellierbaren Bereich. Innerhalb dieser Region sind 36% aller Aminosäuren identisch,

48% aller Aminosäuren können mit funktionell verwandten Aminosäuren des jeweils anderen Proteins direkt in Verbindung gebracht werden. Ab 40% Identität liegt beinahe sicher eine identische Faltung der betrachteten Proteine vor. So kann mit großer Gewissheit davon ausgegangen werden, dass die Faltungsmotive von RmpM und PAP in weiten Zügen einander zumindest ähneln, wenn nicht großteils identisch sind.

Strukturelle Vorhersagen unter Verwendung des PAP-Homologons aus *R. solanaceareum* führten zu Modellen mit identischen Faltungsmotiven und werden hier nicht dargestellt. Sie untermauern jedoch die hier getroffenen Aussagen zusätzlich.

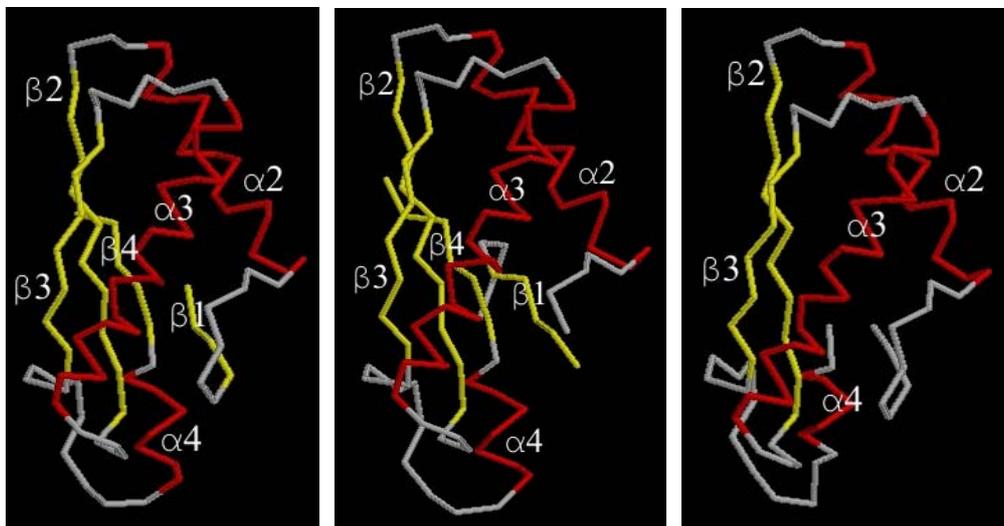


Abbildung 5.39: 3D-Strukturvorhersagen von PAP.

Strukturvorhersagen generiert durch EsysPred3D, 3Dpssm und 3Djigsaw (von links nach rechts). Nummerierung angelehnt an diejenige in der Röntgenstruktur von RmpM. [Abbildung 5.37] Der N-Terminus beginnt oberhalb von $\beta 1$, der C-Terminus endet oberhalb von $\beta 4$. Alle Vorhersagen wiesen ein identisches Faltungsmuster auf, dass ebenfalls hohe Homologien zur Kristallstruktur der gelösten Domäne aufweist.

Tabelle 5.10: Klassifikation der vorhergesagten Sekundärstrukturen von PAP

Element	EsysPred3D	3Dpssm	3Djigsaw
Modellierte Sequenz	88-189	85-190	89-185
∇ -Helix 1	99-114	99-114	99-114
∇ -Helix 2	132-153	132-153	132-153
∇ -Helix 3	177-183	177-183	177-183
\exists -Strang 1	88-91	89-93	
\exists -Strang 2	118-127	118-127	118-127
\exists -Strang 3	160-166	160-166	160-166
\exists -Strang 4	185-189	185-190	

6 Diskussion

Mutagenese und Expression: Um den Einfluss der einzelnen Aminosäuren auf die elektrostatischen Eigenschaften des Argininclusters zu testen, mussten mehrere Mutanten konstruiert werden. Die dafür nötige Klonierung von *omp32* in einen geeigneten Expressionsvektor gelang problemlos. Die nachgeschalteten Mutationen der fünf am Arginin-Cluster beteiligten Aminosäuren erwiesen sich als experimentell aufwändig. Ursprünglich sollten die Mutanten über die Methode der willkürlichen Permutationen nach dem Verfahren des pALTER-Kits erzielt werden. Mithilfe dieses Kits hätte der Einfluss der einzelnen Aminosäuren in allen denkbaren Kombinationen auf den Selektivitätsfilter von Omp32 getestet werden können. Die Anzahl der möglichen Mutanten belief sich auf $3^5 = 243$, da für jede der zu mutierenden drei Argine des Clusters die Aminosäuren Gln und Glu und für die zwei Glutamate des Clusters Arg und Gln eingebaut werden. Aus einer solchen Bibliothek mutierter Plasmide hätten die Vielversprechendsten exprimiert, aufgereinigt und rückgefaltet werden können.

Die Mutagenese über diese Methode erwies sich jedoch als nicht durchführbar. Die Gründe hierfür lagen in der zu geringen Kompetenz der Zellen, Plasmide aufzunehmen. Über diese Methode wurde nur eine einzige Mutante erzielt, die an den Positionen 38, 75 und 133 jeweils von Arg zu Glu mutiert war.

Erst durch die Verwendung der Quikchange-Methode, die einen gezielteren Austausch der Nukleotide über PCR vornimmt, konnten 15 Mutanten generiert werden. Als wichtiger Punkt erwies sich dabei einerseits die DMSO-Konzentration innerhalb der PCR-Ansätze, die erst bei Werten zwischen 5-10% Ergebnisse erzielten, andererseits das Volumen des einzelnen PCR-Ansatzes. PCR-Volumina mit 100 μ l zeigten keinen Erfolg, wohingegen unter ansonsten identischen Bedingungen Volumina mit 30 μ l sehr häufig die gewünschten Resultate erbrachten. Diese Volumenabhängigkeit der PCR ist seit längerem bekannt.^{83,84,85} Bei Berücksichtigung beider Besonderheiten verliefen alle Mutagenesen über die Quikchange-Methode erfolgreich.

Die Verwendung von *E. coli* mit dem pRARE Plasmid, über das verstärkt seltene tRNA der Wirtszelle zur Verfügung gestellt werden, ermöglichte die Produktion von Omp32 in großer Menge. Eine Unterrepräsentierung der entsprechenden Codons kann sowohl zu geringeren Porinmengen, als auch zu verminderter Qualität der erzeugten Proteine führen.⁸⁶ Erste Expressionen durch eine Animpfung der Medienkolben mit einer Stammlösung führte rasch zu sinkenden Ausbeuten an Inclusion-Bodies. Offensichtlich nahmen die Zellen in der kurzen

Zeit, in der sie aufgetaut waren, Veränderungen an ihrer DNA vor und reduzierten somit die Fähigkeit zur Expression. Die Verwendung von tiefgefrorenen Aliquots der Bakterienstämme brachte letztlich den entscheidenden Erfolg. Für jede Expression wurde ein neues Aliquot benutzt, das zuverlässig anwuchs und stets hohe Mengen an Inclusion-Bodies produzierte.

Fremdexpression und Anpassung des Kulturmediums: Omp32 weist bei heterologer Produktion in *E. coli* Toxizität auf, wie einige andere heterolog produzierte Porine ebenfalls.^{87,88,91} Mögliche Gründe dafür sind, dass einerseits durch die starke Überproduktion des Porins die Stabilität der äußeren Membran leiden kann, da die Porine beginnen, lipidarme 2D-Kristalle zu bilden; andererseits wird durch die Selektivität und Spezifität der eingebrachten Porine das natürliche Ionengleichgewicht empfindlich gestört. Insbesondere im Fall von Omp32, dass die bisher stärkste Anionenselektivität aller untersuchten Porine aufweist, wird eine hohe Toxizität erwartet und bei korrekter Lokalisierung des Porins in die äußere Membran von *E. coli* auch beobachtet. Aus Selektivitätsmessungen ist zu schließen, dass für jedes K^+ -Ion etwa 20 Cl^- -Ionen die Pore passieren.⁴⁰ Beide Ionen besitzen einen ähnlichen hydrodynamischen Radius und liegen hydratisiert als Kugel vor. Die natürliche Hauptfunktion von Omp32 in *D. acidovorans* ist nicht die erleichterte Diffusion kleiner Ionen, sondern die Durchleitung von organischen Säuren durch die äußere Membran mit einem wesentlich größeren hydrodynamischen Radius, die im hydratisierten Zustand eine nicht-sphärische Form besitzen und somit die Orientierung der Säure dem Porenverlauf angepasst sein muss. Unter diesen Bedingungen ist die Passage von kleinen Kationen (Metallionen^{X+}) und großen Anionen (organische Säuren^{Y-}) etwa gleich wahrscheinlich. Als Folge davon entsteht kein Ungleichgewicht der Ladungsverteilung über die Membran, die transportierten Ladungen werden sich in der Summe neutralisieren. Dies sind die Gegebenheiten unter natürlichen Lebensbedingungen für *D. acidovorans*.

Unter Laborbedingungen für optimales Wachstum von *E. coli* sind im Medium keine organischen Säuren enthalten, dafür 1% (w/v) NaCl zur Stabilisierung des Ionengleichgewichtes. Bei korrektem Einbau von Omp32 in die äußere Membran von *E. coli* wird ein unnatürlicher Selektivitätsmechanismus in Gang gesetzt, an dessen Ende ein starker Influx von Cl^- -Ionen in das Periplasma und möglicherweise in das Zellinnere steht, der sich toxisch auf die Lebensfähigkeit der Zelle auswirken könnte. Im Gegensatz dazu existieren Porine, die nur eine moderate Anionen- oder Kationenselektivität aufweisen, bei denen die heterologe Produktion und die korrekte Faltung in die äußere Membran von *E. coli* möglich

ist.^{89,90} Eine interessante Möglichkeit, um dieses Problem einer möglichen Toxizität von fremden Porinen zu umgehen wäre demzufolge, das Medium entsprechend anzupassen. Je nach der zu erwartenden Selektivität des betrachteten Porins müssten im Kulturmedium für anionenselektive Porine hydrodynamisch kleine Anionen durch größere ersetzt werden, entsprechend hydrodynamisch kleine Kationen durch größere für kationenselektive Porine. Mit der Wahl der richtigen Parameter bestünde so die Möglichkeit, bisher unzugängliche Porine direkt in die äußere Membran von *E. coli* zu produzieren. Der Umweg über die Bildung von Inclusion-Bodies, die teilweise unter mühsamen Bedingungen wie in dieser Arbeit rückgefaltet werden müssen, könnten so möglicherweise umgangen werden.

Aufreinigung: Viele Porine wurden mittlerweile in *E. coli* als Inclusion-Bodies produziert, um die toxischen Begleiterscheinungen einer nativen Expression zu vermeiden und gleichzeitig die mögliche Ausbeute zu steigern.^{91,92} Es existieren keine veröffentlichten Untersuchungen, die über ein Scheitern der Rückfaltung von heterologem Porinen aus Inclusion-Bodies berichten. Insofern wurde anfangs ein rasches Gelingen der Produktion von korrekt gefaltetem trimerem Omp32 erwartet. Wie dargestellt, ergaben sich jedoch vielfältige Probleme, deren Auswirkungen anfangs nicht abzusehen waren und die den Prozess der Optimierung der Rückfaltung und Reinigung rekombinanten Proteins erheblich erschwerten.

Eines der Probleme stellte die heterologe Zusammensetzung der Inclusion-Bodies dar. Um die Reinheit der erzeugten Inclusion-Bodies anzuheben, wäre eine Expression in einem *E. coli* Stamm vorteilhaft, der noch alle seine natürlichen Proteasen enthält. Der hier verwendete Expressionsstamm BL21(DE3) Rosetta [4.1.1] besitzt einen Defekt in der cytosolischen Lon-Protease. Es wird angenommen, dass die Proteasen Lon, Clp und HslVU⁹³ zu 80% für die Degradierung unkorrekt gefalteter Proteine im Cytoplasma verantwortlich sind.⁹⁴

Unter den Bedingungen einer *omp32*-Expression wird auf die natürlichen, bereits korrekt gefalteten cytoplasmatischen *E. coli* Proteine, sowie diejenigen, die neben Omp32 produziert werden, eine Art „hydrophober Stress“ ausgeübt. Grund dafür ist, dass das Porin durch das Fehlen einer membranösen Umgebung seine natürliche Konformation nicht annehmen kann, dabei eine unkorrekte Faltung einnimmt und aufgrund seiner stetig ansteigenden Konzentration in der Zelle zu aggregieren beginnt, um dabei die gewünschten Inclusion-Bodies zu bilden. Bei diesem Vorgang wird den cytosolischen Proteinen eine große hydrophobe Oberfläche präsentiert. Hinzu kommt, dass die Inclusion-Bodies das zur Lösung von Proteinen verfügbare Volumen reduzieren und über die Effekte des „*macromolecular*

crowding“ die Aggregation von Proteinen fördern.^{95,96} Beide Effekte führen dazu, dass auch cytosolische Proteine destabilisiert werden und teilweise aggregieren. Durch die Präsenz der Proteasen wird dieser Effekt vermindert.⁹⁴ In erster Linie werden diejenigen Proteine proteolytisch angegriffen, die noch nicht vollständig ausgefallen oder aggregiert sind und fehlgefaltete Domänen mit hoher Mobilität aufweisen. Die fehlgefalteten Porine entziehen sich aufgrund ihres hydrophoben Äußeren durch Aggregation rasch dem proteolytischen Zugriff. Bereits aggregiertes Protein kann durch Proteasen nur geringfügig attackiert werden. Die Proteasen spalten in erster Linie die nur teilweise fehlgefalteten cytosolischen Proteine, um so der Bildung von aggregationsfähigem Material vorzubeugen.^{97,98} In den aggregierten Proteinen findet sich dementsprechend weniger verunreinigende, ausgefallene Proteine aus dem Cytosol von *E. coli* bei gleichzeitig sinkender Gesamtmenge an Inclusion-Bodies.⁹⁴ Durch die Verwendung entsprechender Expressionsstämme könnte somit die Reinheit der Inclusion-Bodies erhöht werden, wobei die gesamte Ausbeute verringert wird.

Die Beurteilung der Aufreinigung erfolgte stets unter Berücksichtigung der Rückfaltung und der Trimerisierung, da die Gesamtheit der Methode für den Erfolg ausschlaggebend war. Aus den Experimenten ergab sich, dass die Verweildauer des denaturierten Proteins in 8 M Harnstoff einen entscheidenden Einfluss auf das Trimerisierungsverhalten des Porins ausübt. Es gibt in der Literatur nur sehr wenige Beispiele für dieses Phänomen. Man geht jedoch davon aus, dass Harnstoff Asparagin-Reste des Proteins modifiziert. Dabei wird aus Harnstoff *iso*-Cyanat freigesetzt, das besonders bei den hier verwendeten alkalischen pH-Werten freie Aminogruppen des Proteins carbamylieren kann.⁹⁹ Dieser Effekt tritt umso stärker auf, je länger die Proteine Harnstoff und dem darin enthaltenen *iso*-Cyanat ausgesetzt sind und je höher die Inkubationstemperatur ist. Ein Indiz dafür, dass diese Zerfallsprodukte ebenfalls die Trimerisierung behindern können, ist, dass nur frisch angesetzte Harnstofflösungen zur erfolgreichen Trimerisierung geführt haben und ältere Lösungen unter ansonsten identischen Bedingungen Rückfaltungen mit teilweise hohem Monomeranteil ergaben. Die Verweildauer in Harnstoff musste somit erheblich reduziert werden. Diesem Problem kann auf chemischem Weg durch die Zugabe von freien Aminogruppen begegnet werden, die mit dem gebildeten *iso*-Cyanat abreagieren.

Das schlechte Aufreinigungsverhalten in den anfangs verwendeten Kationenaustauschchromatographien kann zum Teil ebenfalls auf eine mögliche Modifikation von Aminosäureseitenketten zurückzuführen sein. Die Verteilung von denaturiertem Omp32 über den gesamten Elutionsbereich war nicht auf Überladungseffekte zurückzuführen, da die aufgetragene Proteinmenge 30% der vom Hersteller angegebenen maximalen Kapazität nie

überstieg. Verstärkend zu einer Modifikation durch Harnstoff kommt jedoch hinzu, dass die Chromatographien nicht unter optimalen pH-Wert-Bedingungen durchgeführt werden konnten. Der isoelektrische Punkt von Omp32 liegt bei 8,6. Damit wurden die Trenneigenschaften der Säulen nicht optimal ausgenutzt, da die höchsten benutzten pH-Werte 6,2 nicht überstiegen. Die dabei beobachteten Verunreinigungen (z.B. [Abbildung 5.7]) entstehen entweder durch die intrinsischen *E. coli* Proteine mit basischem IEP, oder durch proteolytische Prozessierungen von Omp32. Dafür sprechen würde, dass diese verunreinigenden Proteine ein geringeres Molekulargewicht als Omp32 aufweisen, bei höherer Ionenstärke eluieren und somit einen höheren IEP aufweisen. Die ersten 150 Aminosäuren von Omp32 weisen für sich allein betrachtet einen IEP von 5,2 auf, wohingegen die restlichen Aminosäuren einen IEP von 9,2 besitzen.

Die Verwendung von Guanidiniumhydrochlorid als alternatives denaturierendes Agens musste verworfen werden, da sich frühzeitig eine Inkompatibilität mit den verwendeten Additiven abzeichnete. Im Gegensatz zu erfolgreich verlaufenen Rückfaltungen, ausgehend von in GuaHCl denaturiertem Porin,^{100,101} gestaltete sich eine folgende Rückfaltung als nicht möglich, was auf eine Fehlfaltung des Porins in verdünnter GuaHCl-Lösung schließen lässt. In den hier durchgeführten Experimenten konnte Omp32 nur durch hochmolares Arginin in Lösung gehalten werden. Dabei stabilisierten wahrscheinlich ionische Wechselwirkungen zwischen Arginin und fehlgefaltetem Porin das Protein so, dass es während der Rückfaltung nicht aggregierte.^{102,103} Durch die nachgeschalteten Dialysen wurde Arginin unter eine kritische Konzentration verdünnt, wodurch das in einer fehlerhaften Konformation gefaltete Omp32 durch das Fehlen der stabilisierenden Wirkung von Arginin nahezu quantitativ ausfiel.

Im Gegensatz dazu trat dieser Ausfällungseffekt mit in Harnstoff denaturiertem Omp32 nicht immer auf. Insbesondere nach Beendigung der Kationenaustauschchromatographien genügte eine Verdünnung allein mit Wasser nicht, um das Protein auszufällen. Ausschlaggebend dafür ist die relativ geringe Hydrophobizität der völlig entfalteten β -Barrel-Proteine im Gegensatz zu den α -helikalen Proteinen der inneren Membran. Das Porin ist dabei hydrophiler als in einer vollständig fehlerhaften Faltung. Dieses Verhalten ist teilweise auch von anderen Porinen bekannt, die ebenfalls bei starker Verdünnung des denaturierenden Agens in Lösung bleiben und dabei eine nur teilweise gefaltete Konformation einnehmen.^{100,104,105,106} Dies kann für einige Applikationen ausreichend sein, die von diesem Zustand des teilweise gefalteten Porins aus eine weitergehende Faltung einschlagen, reichte aber für die Anforderungen in dieser Arbeit jedoch nicht aus.

Es gibt ebenfalls Beispiele für die erfolgreiche Verwendung von Detergenzien zur Reinigung von Porinen aus Inclusion-Bodies, um nach anschließender Denaturierung reine Porinmonomere zu erhalten.^{8,101,107,108} Dabei werden ebenfalls Detergenzien verwendet, die nicht in der Lage sind, das gewünschte Protein aus den Inclusion-Bodies zu lösen und somit indirekt anzureichern. Dabei scheint es keine Richtlinie zu geben, welche Detergenzien für eine Reinigung der Inclusion-Bodies am besten geeignet sind. So wurden sowohl nicht-ionische Detergenzien (vornehmlich TritonX-100), ionische Detergenzien (z.B. Deoxycholat) als auch zwitterionische Detergenzien (z.B. LDAO) eingesetzt. Die Detergenzien wurden hauptsächlich dafür verwendet, nach der Zellernte und Lysierung die Inclusion-Bodies von den sedimentierten Membranen zu trennen.

In dieser Arbeit wurde in der abschließenden Methode für die Aufreinigung der Inclusion-Bodies eine Abfolge aus zwei Detergenzien verwendet: Lauroyl-Sarkosin (ionisches Detergens) zur Abtrennung der Membranen, sowie Zwittergent3-14 zur Reinigung der Inclusion-Bodies. Lauroyl-Sarkosin erwies sich dabei als verhältnismäßig starkes Detergens, da es bei Erhitzung nicht nur die Membranen, sondern auch die Inclusion-Bodies auflöste. Zwittergent3-14 war dazu auch unter Kochen für 20 min nicht in der Lage, löste jedoch eine Vielzahl von störenden Proteinen aus den Inclusion-Bodies heraus und erzielte somit den gewünschten Reinigungseffekt, ohne den Einsatz einer chromatographischen Aufreinigung. Dieser Verzicht war nötig, um den Einsatz von Harnstoff so kurz wie möglich halten zu können.

Es ist keine Aufreinigung eines Porins bekannt, die gänzlich auf einen Chromatographie-schritt verzichten konnte. Es wurden in allen dahingehend durchgesehenen Veröffentlichungen Kombinationen aus Gelchromatographie, Ionenaustauschchromatographie, bzw. Affinitätschromatographien durchgeführt. Die letztlich hier ausgearbeitete Methode kommt ohne Chromatographie aus und kombiniert die für die Lösung von verunreinigenden Proteinen, sowie die für die Rückfaltung und Trimerisierung günstigen Eigenschaften verschiedener Detergenzien. Diese Strategie führte zu einer befriedigenden Ausbeute und der gewünschten Qualität der Porinvarianten. Sie stellt damit eine Alternative zu Chromatographie-gestützten Verfahren dar.

Rückfaltung und Trimerisierung:

Die gängigste Methode der Rückfaltung von Porinen aus denaturiertem Material ist eine Verdünnung in Detergens-haltigem Puffer, entweder über Dialyse oder durch Extension des

Probenvolumens.¹⁰⁹ Dabei fällt die Konzentration des denaturierenden Agens unter eine kritische Grenze, in der das Porin nicht mehr in Lösung gehalten werden kann. Die verwendeten Methoden hierzu sind vielfältig und benutzen unterschiedliche denaturierende Agenzien, Puffersysteme und Detergenzien.¹¹⁰ In einigen Fällen werden für die korrekte Rückfaltung des Porins sehr spezifische Bedingungen benötigt, wie z.B. TritonX-100 als Detergens mit aromatischer Kopfgruppe für eine korrekte Faltung von PhoE.¹¹¹ Dies war für Omp32 nicht notwendig, das mit mehreren der verwendeten Detergenzien eine Multimerisierung aufwies. Dabei erwiesen sich ungeladene Detergenzien besser geeignet als geladene oder zwitterionische. Je nach Art des Detergens und Aufreinigung ergaben sich Unterschiede in der Beschaffenheit der Porinpräparation, die großen Einfluss auf das Trimerisierungsverhalten ausübten. Es hat insgesamt den Anschein, dass von den Detergenzien diejenigen mit einer Octyl-Gruppe als hydrophober Anteil den besten und auch häufigsten Trimerisierungserfolg aufwiesen. Bei den meisten anderen Porinen mit 16 β -Strängen führten zwitterionische Detergenzien zum Erfolg.¹¹⁰ Eine Ausnahme hierzu stellt OmpF dar, das ebenfalls mit OPOE rückgefaltet wurde.¹⁰⁰ Hier liegt aber in den fertigen Mizellen ein Gemisch aus SDS, OPOE und Asolektin vor - somit ein inhomogenes System - das für Kristallisationen ungeeignet und für Leitfähigkeitsmessungen nachteilig ist. Versuche mit dem Detergens DDM ergaben als einzige reproduzierbar einen hohen Anteil von dimeren Porin neben wechselnden Anteilen von Monomeren und Trimeren. Dies steht im Gegensatz zu einer Arbeit, in der der Einfluss unterschiedlicher Detergenzien auf das Multimerisierungsverhalten von OmpF untersucht worden ist.¹¹² Dabei stellte sich heraus, dass insbesondere länger-kettige Detergenzien mit einem stark hydrophoben Anteil besser in der Lage sind, die Trimerisierung von monomerem OmpF zu initiieren. Kürzer-kettige Detergenzien wiesen eine schlechtere Trimerisierungswirkung auf, so war das relativ kleine OG in diesem Fall nicht in der Lage, OmpF korrekt rückzufalten.¹¹³ Erst durch die Verwendung von gemischten Mizellen kann OmpF mit OG rückgefaltet werden, wobei wahrscheinlich anionische Detergenzien wie SDS eine erste Faltung katalysieren, indem sie die Bedingungen der Membran nachahmen.¹¹² Die in dieser Publikation erzielten Trimerisierungsgrade aller verwendeten Detergenzien waren niedrig und betrug niemals mehr als 20%.

Für Omp32 stellt sich offensichtlich ein entgegengesetztes Verhalten dar; DDM ist für die Trimerisierung schlechter geeignet als die kürzer-kettigen Detergenzien OPOE, OG und OTGP. Rückfaltungs- und Trimerisierungsversuche, die von in SDS denaturiertem Omp32 ausgehen, verliefen niemals vollständig bzw. zeigten keinerlei Trimerisierung des Porins. Es

ist anzunehmen, dass die Zusammensetzung und die Charakteristika der äußeren Membranen von *E. coli* sowie *D. acidovorans* vergleichbar sind. Es ist deswegen umso bemerkenswerter, dass sich beide Porine unterschiedlich verhalten. Auch andere Veröffentlichungen zur Rückfaltung und Trimerisierung von Porinen mit 16 β -Strängen berichten einerseits von sehr aufwändigen Experimenten, um den Effekt unterschiedlicher Detergenzien bei der Rückfaltung zu berücksichtigen,¹¹⁴ andererseits auch von anderen erfolgreich verwendeten Detergenzklassen.^{8,111,115} Es wird somit deutlich, dass es nach wie vor keine allgemeingültige Methode für die Detergenzwahl bei der Rückfaltung von Porinen existiert. Obwohl diese Gruppe von Proteinen strukturell als sehr homogen angesehen werden kann und der physikochemische Charakter der äußeren Membranen von Gram-negativen Bakterien vergleichbar sein sollte, benötigen die Porine offensichtlich unterschiedliche Konditionen für ihre Rückfaltungen. Es ist vorstellbar, dass ihre sonstigen physikalischen Eigenschaften, wie der IEP, die Höhe des β -Barrels und die Ausprägung des Lysingürtels an der Kontaktgrenze zur exoplasmatischen Seite der äußeren Membran Einfluss auf den Rückfaltungsprozess nehmen.

Ein problematischer Punkt, der die Optimierung der Trimerisierung stark beeinträchtigte, war die äußerst geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Eine bereits angesprochene mögliche Erklärung dafür ist die Modifizierung des Proteins durch Harnstoff-Derivate. Eine andere Möglichkeit ist die Wirkung von „Chaperon-Molekülen“. Es gibt Spekulationen über eine katalysierte Faltung von Porinen durch Chaperone im Periplasma, in denen als „Chaperone“ keine Proteine, sondern besondere Lipopolysaccharide zum Einsatz kommen.^{116,117,118} Dabei ist es möglich, dass LPS erst spät in den Faltungsprozess eingreift und das Porin unterstützt, stabile aber fehlgefaltete Konformationen wieder zu verlassen. Es ist denkbar, dass Omp32 *in vivo* ebenfalls Unterstützung während der Faltung durch solche „Lipo-chaperone“ erhält. Für eine solche Funktion kommen in diesem Fall nur LPS aus *E. coli* in Frage, da Omp32 heterolog produziert wird. Aus den durchgeführten Experimenten war bekannt, dass die Inclusion-Bodies eine hohe Affinität zu hydrophoben Substanzen aufweisen, insbesondere zu TritonX-100, das auch nach mehreren Waschschritten spektroskopisch nachgewiesen werden konnte. Es ist somit möglich, dass auch Spuren von LPS in unterschiedlicher Menge an den Inclusion-Bodies haften bleiben und die Rückfaltung sowie Trimerisierung beeinflussen. Die entsprechenden Präparate wurden nicht auf ihren LPS-Gehalt hin untersucht. Der Einfluss von Detergenzien als Substitute für Lipo-chaperone wurde untersucht, indem TritonX-100 als Detergens mit aromatischer Kopfgruppe zusätzlich zu den Rückfaltungspuffern zugesetzt wurde, wie im Falle von PhoE.¹¹¹ Dies verlief jedoch ohne zusätzlichen Effekt auf das Trimerisierungsverhalten. Es kann also ausgeschlossen werden, dass eine der bei der

Reinigung bzw. Rückfaltung von Omp32 verwendeten Detergenzien den Effekt eines Lipo-chaperones ausüben könnte.

Bei den meisten Rückfaltungsversuchen anderer Porine waren Teilerfolge wie unvollständige Trimerisierungen ausreichend, da eine nachgeschaltete Gelchromatographie die nötige Trennung von Trimeren und Monomeren bewerkstelligte. Es ist keine in der Literatur beschriebene Methode bekannt, die ohne Verwendung einer Chromatographie ausschließlich trimeres Porin ergibt. Im vorliegenden Fall konnte eine Gelchromatographie nicht verwendet werden, da sie weder Monomere und Trimere effizient trennte, noch Trimere lieferte, die im Verlauf der weiteren Aufarbeitung stabil blieben.

Ein wichtiger Punkt in der Rückfaltungsprozedur, der für reine Trimere notwendig war, war eine lange Inkubationsdauer bei 55°C. Diese Methode ist neu und bisher noch nicht beschrieben. Die einzige Arbeit, in der Monomere über einen Temperaturschritt denaturiert wurden,¹¹¹ diente der Analyse des Trimer/Monomer-Verhältnisses der betrachteten Porine. Ebenfalls erwies sich eine hohe Argininkonzentration als notwendig für eine vollständige Trimerisierung.

Malatbindung und Leitfähigkeitsmessungen:

Die Untersuchungen zur Bindung von radioaktivem Malat verliefen nicht erfolgreich. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in den Waschschritten, die nötig sind, um überflüssiges Malat zu entfernen. Aufgrund der geringen Bindekonstante ist es wahrscheinlich, dass in der Konstriktionszone von Omp32 gebundenes Substrat während der beiden Waschschriffe ausgewaschen worden ist. Die Unterschiede entstammen aus unterschiedlichen Mengen an membrangebundenen radioaktivem Malat. Die gemessenen Werte weisen in diesem Experiment nicht auf eine Bindung hin.

Die durchgeführten Leitfähigkeitsmessungen an rekombinantem Omp32 wurden in erste Linie durchgeführt, um die ermittelten Werte in Relation zu nativ isoliertem Omp32 zu setzen. Beim Vergleich dieser Porin-Präparationen konnte der funktionelle Nachweis erbracht werden, dass das rekombinante Porin identische Eigenschaften wie das nativ isolierte Porin aufweist. Dieses Ergebnis bestätigt die Anwendbarkeit der Rückfaltungsprozeduren. Es ist deswegen zu erwarten, dass die so hergestellte Omp32-Mutanten eine vergleichbare Struktur aufweisen. Zukünftige Untersuchungen zur Leitfähigkeit und Selektivität der Omp32-Varianten lassen deshalb Rückschlüsse auf die funktionelle Wirkung der ausgetauschten Aminosäuren im Kanal zu.

Als Folge dieser Untersuchungen stellte sich heraus, dass Omp32 einen nahezu linearen Ionenstrom für Na-Malat aufweist. Dieser erreicht bereits bei geringen Molaritäten (unterhalb von 50 mM) eine nahezu vollständige Sättigung, und nimmt nur sehr langsam linear im weiteren Verlauf zu. Dabei setzt sich der Stromfluss aus den Einzelflüssen von Malat-Ionen, sowie von Na^+ -Kationen zusammen. Der Malat-Anteil erreicht dabei rasch einen Sättigungswert, woraus auf eine Bindestelle innerhalb des Kanals geschlossen werden kann. Na-Ionen, die nicht an die Poreninnenwand binden, können die Pore weiterhin passieren, werden aber aufgrund der Filtereigenschaften des Porins bei der Passage behindert. Der Anstieg des Na-Stroms ist linear auf erhöhte Na-Konzentrationen bei höheren Na-Malat-Konzentrationen zurückzuführen.

Unter der Annahme, dass die physiologische Aufgabe von Omp32 *in vivo* die Durchleitung von großen anorganischen Säuren sowie kleine Kationen im Verhältnis 1:1 ist, kann qualitativ auf eine „gewünschte“ Ionenstärke im Umgebungsmedium des Bakteriums für die jeweiligen Salze der organischen Säuren geschlossen werden. Diese Konzentration ist erreicht, sobald der Na^+ -Ionenstrom einen identischen Anteil zum Gesamtstrom wie der Malat-Strom beiträgt. Wenn beide Ströme den gleichen Wert erreichen, bedeutet das, dass eine identische Anzahl von elektrostatisch benachteiligten Na^+ -Kationen wie sterisch benachteiligte Malat-Anionen durch das Porennere wandern. Es ist aus der hier vorgenommenen Messung [Abbildung 5.31] nicht möglich, eine genaue Aussage über die entsprechende Na-Malat-Konzentration zu treffen. Zudem stehen noch weitere Messungen aus, in denen auch andere mögliche Substrate, Salze kleinerer metallischer Kationen und größerer organischer Anionen betrachtet werden. Zusätzlich ist noch unklar, welche Auswirkung die externe angelegte Spannung auf dieses Verhalten besitzt.

Durch die Leitfähigkeitsmessungen konnte demonstriert werden, dass Omp32 eine Bindestelle für organische Säuren, im hier nachgewiesenen Fall für Malat im millimolaren Bereich aufweist. Diese Bindungskonstante ist wahrscheinlich um ca. zwei Größenordnungen geringer als die der „greasy slide“ der zuckerspezifischen Porine.^{119,120} Eine Erklärung dafür ist, dass Omp32 eine Vielzahl verschiedener organischer Substanzen als Substrate akzeptieren muss, und eine zu starke Spezialisierung einer möglichst quantitativen Aufnahme von Nährstoffen entgegen stünde. Diese Beobachtung steht jedoch im Gegensatz zu der bisherigen Auffassung über die Funktionalität der Proteine der äußeren Membran von Bakterien. Daraus lässt sich herausfinden, wie viele β -Stränge ein Protein der äußeren Membran aufweist, Rückschlüsse auf dessen allgemeine Funktion ziehen. So sollen Proteine mit 16 β -Strängen als unspezifische Porine der äußeren Membran dienen, und dabei maximal

eine Selektivität über die jeweiligen elektrostatischen Eigenschaften aufweisen. Eine Bindungsstelle für Substrate ist bisher in keinem dieser „allgemeinen Diffusions-Porine“ mit 16 β -Strängen beobachtet worden. Der hier eindeutig über die Leitfähigkeit erbrachte Nachweis einer solchen Bindungsstelle steht somit im Gegensatz zu dem bisher gültigen „Dogma“ der Unspezifität der Porine mit 16 β -Strängen. Omp32 ist bisher das einzige Porin dieser Klasse mit einer Substratbindung, dennoch ist es sehr unwahrscheinlich, dass es die alleinige Ausnahme darstellt. Vielmehr ist zu erwarten, dass sich bei anderen, eventuell noch nicht beschriebenen Porinen mit eingehenderen Untersuchungen ebenfalls Substratbindungsstellen nachweisen lassen. Die Einteilung der Funktionalität von Proteinen der äußeren Membran von Bakterien anhand der Zahl der β -Stränge sollte in Frage gestellt, wenn nicht sogar verworfen werden.

Im hier betrachteten Fall von Omp32 beträgt die Leitfähigkeit für KCl etwa die Hälfte dessen, was für strukturell verwandte Porine^{121,122,123} beobachtet worden ist, und liegt damit in derselben Größenordnung wie die der stark zuckerspezifischen Porine.^{124,125,126,127} Zudem weist Omp32 den kleinsten Porenquerschnitt aller bisher betrachteten Porine auf, nur wiederum die zuckerspezifischen Porine weisen ähnliche Durchmesser ihrer Konstriktionszonen auf. [Abbildung 3.3] Diese Porine besitzen nachgewiesenermaßen eine Substratbindung. Möglicherweise lässt sich anhand der beiden Parameter „Leitfähigkeit von KCl“, sowie „geringster Porendurchmesser der Konstriktionszone“ eine bessere Klassifizierung von Proteinen der äußeren Membran als durch die bisherige Abzählung der β -Stränge zuweisen. Dabei kommt dem Porendurchmesser eine besonders große Bedeutung zu, da dieser unabdingbare Voraussetzung für eine Spezifität ist. Einerseits muss das Substrat möglichst nahe an der Bindungstasche vorbeigeführt werden, andererseits zugleich unerwünschte Substanzen so quantitativ wie möglich außen vorgehalten werden. Unspezifische Porine weisen einen größeren Porenquerschnitt auf, um dem breiteren Spektrum an gewünschten Substanzen weniger Widerstand zu bieten. Ein geringer Porenquerschnitt wäre demzufolge in den meisten beobachtbaren Fällen mit einer Substratspezifität verbunden. In indirektem Zusammenhang damit steht die Leitfähigkeit von KCl. Diese wird einerseits durch den Porenquerschnitt beeinflusst, zum anderen durch Wechselwirkungen mit Ladungen der Poreinnenwand, die umso stärker sind, je enger die Pore gestaltet ist. Ein geringer Leitfähigkeitswert weist also verlässlicher als die Zahl der β -Stränge des Proteins auf eine mögliche Substratspezifität hin.

PAP: Die Identifizierung der Gensequenz von PAP wurde von mehreren Personen in Angriff unternommen, die aber bisher stets fehlschlugen. Anfangs konnte nur von einer Länge von 51 Aminosäuren ausgegangen werden, deren Aminosäuresequenz über Edman-Abbau identifiziert wurde.⁶⁴ In der Zwischenzeit wurden aufgrund der Vielzahl von Genomsequenzierungen mehrere neue Proteinsequenzen bekannt, die gute Homologien mit den identifizierten 51 Aminosäuren von PAP aufweisen. Diese stammen hauptsächlich von den Klassen *Ralstonia* und *Neisseria* ab und besitzen im prozessierten Zustand etwa 200 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 22 kDa. Diese auffallende Diskrepanz zwischen dem gefundenen PAP und seinen wesentlich größeren Homologen galt es aufzuklären.

Durch die hier verwendete, aus den bisher bekannten Porinen Omp32 und Omp21 von *D. acidovorans* abgeleitete „codon usage“, die die Anzahl der benutzten Triplets auf nur 29 einengt, wurde eine erste Gensequenz von PAP zugänglich. Über insgesamt vier Methoden wurde die vollständige Sequenz gelöst. Ursprüngliche Fehler in der Aminosäuresequenz durch fehlerhafte Annotationen während der Edmansequenzierung konnten ausgeglichen werden. Die resultierende Information und die daraus erhaltene Aminosäuresequenz stimmen gut mit den oben erwähnten deponierten Informationen von Genomdaten aus anderen Gramnegativen Bakterien überein.

Erst kürzlich wurde die Struktur der C-terminalen Domäne von RmpM gelöst, einem sequenzverwandten Protein aus *N. meningitides*. Es weist dabei eine Faltung ähnlich wie OmpA auf.⁸² In eine Tasche dieser Domäne wird das Murein des Peptidoglykans nicht-kovalent gebunden. Interessanterweise deuten einige Daten darauf hin, dass im Gegensatz zum offensichtlich trimeren PAP⁴⁹ aus *Delftia acidovorans* RmpM funktionell als Dimer vorliegt.⁸² Es bindet dabei an das trimere Porin PorA¹²⁸ von *Neisseria meningitides*. Dabei ist unklar, wie die ungleiche Stöchiometrie kompensiert wird und dennoch eine Stabilisierung des Porinkomplexes erzeugt werden kann. Dies steht im starken Kontrast zur Stöchiometrie im Omp32-PAP-Komplex, die mit 3:3 ausgeglichen ist. Es existieren Hinweise darauf, dass die gelöste Struktur der C-terminalen Domäne von Proteinen mit diesem Faltungsmotiv in mehreren Multimerisierungszuständen auftreten kann. So erscheint die entsprechende Peptidoglykan-bindende Sequenz in OmpA als Monomer,¹²⁹ in RmpM⁸² und PAL¹³⁰ als Dimer. In einer der ersten identifizierten Faltung dieser Art, der Chorismatmutase aus *B. subtilis*, tritt sie sowohl als Trimer als auch als Tetramer auf.¹³¹ Diese enorme Reichweite an unterschiedlichen Multimerisierungsformen erlaubt den C-terminalen Strukturen von RmpM und PAP, die einander sowohl von der Primärsequenz, als auch von der Struktur her stark ähneln, Dimere bzw. Trimere auszubilden. Diese Fähigkeit ist bemerkenswert, auch unter

dem Aspekt, dass über die Multimerisierung von PAP bzw. von PAP-Homologen mit ihren ebenfalls teilweise multimeren Zielmolekülen eine stabile Verbindung eingegangen werden muss. Dabei wird Omp32 und PorA an die N-terminalen Domänen, sowie zugleich C-terminal Peptidoglykan in teilweise unterschiedlicher Koordination gebunden.

Es existieren keine Hinweise darauf, dass PAP in *D. acidovorans* an andere Moleküle binden kann. Für eine Interaktion von RmpM mit anderen Proteinen wie PorB¹²⁸ und TonB¹³² der äußeren Membran von *N. meningitides* existieren jedoch Beispiele, in denen ebenfalls die multimeren Formen stabilisiert werden. Ähnliches gilt für PAL aus *E. coli*, wobei hier primär Wechselwirkungen mit dem TolA/B-System auftreten.¹³³ Das TolA/B-System kann jedoch ebenfalls an Porine der äußeren Membran binden und somit entsteht eine indirekt Verbindung von PAL zu den Porinen.¹³⁴ Eine direkte Interaktion in dieser Richtung konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass ähnliche Querverbindungen, bzw. Interaktionen zwischen PAP und anderen Porinen von *D. acidovorans* existieren.

Erste Versuche, PAP nativ aus *D. acidovorans* zu gewinnen, scheiterten an den sehr rigiden Bindungen von PAP an Omp32 und an die Peptidoglykan-Schicht, die weder durch milde denaturierende Bedingungen, noch durch Additive wie hochmolare Salzlösungen aufgebrochen werden konnten. In anderen Arbeiten gelingt diese Trennung und eine Reinigung von PAP⁶⁰ bzw. PAP-homologen Proteinen^{130,135} in wenigen Schritten und ohne weitere Komplikationen. Dafür könnte insbesondere im Fall von RmpM das beschriebene Dimerisierungsverhalten⁸² ein Indiz sein für die einfachere Abtrennung der PAP/PAL-Proteine von ihren jeweiligen Porinen. Es bleibt letztlich zu hoffen, dass durch die in dieser Arbeit gelöste Gensequenz von PAP die Struktur des Proteins und seiner Eigenschaften gelöst werden kann.

7 Anhang

7.1 Verwendete Abkürzungen

	Abzentrifugieren
	Resuspendieren
[]	Konzentration
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
AA	Aminosäure
abs.	absolut
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel, Zerfälle pro Sekunde
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propanesulfonat
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälbern
CU	„codon usage“
<i>D. acidovorans</i>	<i>Delftia acidovorans</i>
Da	Dalton (1 D = g/mol)
ddH ₂ O	MilliQ-Wasser, deionisiert
DDM	Dodecylmaltosid
ddNTP	Didesoxynukleotide
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonukleinsäure-abbauende Enzym
dNTP	Desoxynukleotide
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FTIR	Fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie
FU	<i>fluorescence units</i> (Fluoreszenzeinheiten)
g	Gramm, bzw. 1-fache Erdanziehung
GuaHCl	Guanidiniumchlorid
h	hour (Stunde)

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IEP	isoelektrischer Punkt
Inclusion-Bodies	<i>Inclusion-Bodies</i> (Proteininklusioenen im Cytoplasma)
k	kilo (10^3)
kbp	Kilobasen
K_m	Michaelis-Konstante
LB	Lauria-Bertani-Medium
LDAO	Lauryldimethylaminoxid
LPS	Lipopolysaccharid
LS	N-Lauroyl-Sarkosin
m	milli (10^{-3})
M	molar
Mbp	Millionen Basenpaare
min, ' (PCR)	Minute
n	nano (10^{-9})
N ₂ liq.	Flüssiger Stickstoff
OD _{xxx}	Optische Dichte (Absorption) bei xxx nm
OG	beta-Octylglucosid
Omp32	Outer membran protein 32 kDa
<i>omp32, omp21</i>	für Omp32 bzw. Omp21 codierende Gensequenz
OPOE	beta-Octylpolyoxyethylen
ori	<i>origin of replication</i> (Ursprung der Replikation)
OTGP	beta-Octylthioglucopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	Porin-associated protein
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Poly-Ethylenglykol
Pol.	Polymerase
QC	Mutagenesemethode mittels Quikchange Kit
RNase	Ribonukleinsäure-abbauendes Enzym
RT	Raumtemperatur
rWT	rekombinanter Wildtyp
s, ''(PCR)	Sekunde

SDS	<i>sodium-dodecyl-sulfate</i> (Natrium-Dodecylsulfat)
SN	Überstand
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
U	Unit (internationale Enzymeinheit)
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
wWT	Wildtyp nativ aus <i>D. acidovorans</i> isoliert
WZ	Wellenzahlen
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren

Ala, A	Alanin	Leu, L	Leucin
Arg, R	Arginin	Lys, K	Lysin
Asn, N	Asparagin	Met, M	Methionin
Asp, D	Asparaginsäure	Phe, F	Phenylalanin
Cys, C	Cystein	Pro, P	Prolin
Gln, Q	Glutamin	Ser, S	Serin
Glu, E	Glutaminsäure	Thr, T	Threonin
Gly, G	Glycin	Trp, W	Tryptophan
His, H	Histidin	Tyr, Y	Tyrosin
Ile, I	Isoleucin	Val, V	Valin

Nukleobasen

A	Adenin
C	Cytidin
G	Guanin
R	Adenin, Guanin
S	Cytidin, Guanin
T	Thymidin
Y	Cytidin, Thymidin

7.2 Verwendete Oligonukleotide

Name	Varianz	pmol/ μ l	ng/ μ l	Länge	Tm	Sequenz
Primer für die Klonierung von <i>omp32</i>						
pETP1-For-92		9,1	101	34	74,3	ccgcaatgcatatgTCTCCGTGACCTGTTCCGG
pETP2Rev-1094		7	73	32	69,8	caggaattcATTAGAAAGCGTGGCGAATGCCG
TOPOP1-For92		12,8	116	28	70,5	ATGTCCTCCGTGACCTGTTCCGGTATCG
TOPOP2-Rev1093		7,8	63	25	66,2	TCATTAGAAAGCGTGGCGAATGCCG
Primer für die Generierung von PAP-Sequenzen						
PAP P1	4	12,4	23,2	23	62,8	ACCATYGACAACTGGCARAACGG
PAP P2 Rev	16	10,6	4,3	20	64,5	GGCTTCAGNGRCCRCAGAC
PAP P1/RI	8	8,1	10,9	33	65,9	nnnngaattcACCATYGACAACTGGCARAACGG
PAP P2/RI	16	9,8	6,0	30	67,4	nnnngaattcGGCTTCAGNGRCCRCAGAC
PAPLONGP2 Rev	96	9	1,1	37	66,9	cggaattCATATGGCNGACGGYAAAYAAGAABATYGAC
PAPLONGP1 For	144	8,3	0,6	32	71,1	cggaattCVACBGCTTCAGNGRCCRCAGTC
Lasse_FD		100	943	29	68,6	nnnngaattcGGTGTGCCCGMCGGCGATG
from Mlu: PAP for		100	650	20	65,5	TCCGTTCCCGCGCTGAAGC
PAP180AAfor/RI		100	1073	33	64,2	nnnngaattcAGAACCAGCTTACTACTGAAGGC
						nnnngaattc
PAP130AArev/RI		100	1040	32	65,9	GGTCATCCAGCTTGGCCTTGCC
PAP pure start close		100	715	22	60,3	GTGATGGTCACTGATAACGTCC
PAP pure start ubiG		100	650	20	57,9	AGCTGGAGAAATTTCCAGC
PAP pure end far		100	650	20	59,4	ATTGCGTTGCTCATGGCTCG
PAP pure end close		100	650	20	57,3	TAAAAAAGCCCGTTGCCG
Primer für die Sequenzierung von PAP						
SeqPAPfor		100	618	19	60,2	AAGAACGGCAGCAACGAAC
SeqPAPrev		100	618	19	60,2	TTCGTTCGTGCGTTCTTC
Seq PAP for/RI		100	1008	31	63,1	AACTGTGAATTCGCGATGCCAACTGGACGCC
Seq PAP rev/RI		100	1040	32	57,1	TCGTTTCAATTTCTTCCACACCAGTTCCGT
Karin-PAP-for		100	683	21	65,7	GGCACCAGCGAACTGGTGTGG
Karin-PAP-rev		100	650	20	67,6	AGCTGCTGCAGTGGCGGGCG
Primer für Mutagenese nach pALTER						
Mut AO32 Seq-Pfor		100	618	19	68,8	GGCACCAGCGCGCTTCCA
Mut AO32 Seq-Prev		100	683	21	62,6	GAAGTTGGGGTGTAGTACGA
pBAD-TOPO-For		100	585	18	56,0	TCTGGATCCGGTGTATGAC
pBAD-TOPO-Rev		100	618	19	56,7	GGTTAGGATAGGCTTACC
LinkAmp1						aggcacagtcgaggacttatccta
LinkAmp2						gcctctgaatactttcaacaagttac
RRRQE-F		8,1	100	38	77,6	CCGAAGCTTTCGCCTTGACCCAGAAGCCCGCTTCAG
RRRQE-R		6,8	84	38	77,6	CTGAAGCGGGCTTCTGGCTGCAAGCGAAATCTTCGG
RRRNE-F		7,1	88	38	76,6	CCGAAGATTTTCGCCGTCAGCCAGAAGCCCGCTTCAG
RRRNE-R		6,3	78	38	76,6	CTGAAGCGGGCTTCTGGCTGAACGGCGAAATCTTCGG

RRRDE-F	54,9	589	33	75,8	CCGAAGATTTGCCATCCAGCCAGAAGCCCGCC
RRRQQ-F	5,1	99	60	81,9	GGCGTTGCCATCGTCACCGAAGATTTGGCCTTGCAGCCAGAAGCCCGC CTTCAGACCACC
RRRQQ-R	4,3	75	54	80,7	CTGAAGGCGGGCTTCTGGCTGCAAGGCCAAATCTTCGGTGACGATGGC AACGCC
RREEE-F	7,6	119	48	77,6	GTAGTACGAGATCAGGTTGTTAGCTTCGATGCCGTTGTCGTCGGCGCC
RREEE-R	4,7	73	48	77,6	GGCGCCGACGACAACGGCATCGAAGCTAACCACTGATGCTACTACTAC
RRQEE-F	7,1	111	48	77,6	GTAGTACGAGATCAGGTTGTTAGCTTGATGCCGTTGTCGTCGGCGCC
RRQEE-R	6,9	108	48	77,6	GGCGCCGACGACAACGGCATCCAAGCTAACCACTGATCTCGTACTACTAC
REREE-F	5,3	76	44	78,7	GCCCCGACAGGCTCACGGTGGAACTTCCTTGAAGTTGAAGCCGC
REREE-R	4,3	61	44	78,7	GCGGCTTCAACTTCAAGGAACGTTCCACCGTGCGCCGTGTCGGGC
RQREE-F	6,1	87	44	78,7	GCCCCGACAGGCTCACGGTGGAACTGCTTGAAGTTGAAGCCGC
RQREE-R	7,5	107	44	78,7	GCGGCTTCAACTTCAAGCAACGTTCCACCGTGCGCCGTGTCGGGT
ERREE-F	7,7	98	39	83,6	CCGTGCCGCGCAGGCCAGTTCGCTCGTGAAGCGCCGC
ERREE-R	6,2	79	39	83,6	GCGGCGCTTCCACGAGCGAACTGGGCTGCGCCGACCG
QRREE-F	7,4	94	39	83,6	CCGTGCCGCGCAGGCCAGTTCGCTCGTGAAGCGCCGC
QRREE-R	7,8	99	39	83,6	GCGGCGCTTCCACGAGCCAACCTGGGCTGCGCCGACCG
RRRRR-F	5,1	90	54	82,2	GGCGTTGCCATCGTCACCGAAGATACGGCCACGCAGCCAGAAGCCCGC CTTCAG
RRRRR-R	5	88	54	82,2	CTGAAGGCGGGCTTCTGGCTGCGTGGCCGTATGTTTCGGTGACGATGGC AACGCC
Primer für Mutagenese nach QuikChange					
QC RRRDE-F	51,3	484	29	71,7	CCGAAGATTTGCCATCCAGCCAGAAGCC
QC RRRDE-R	92	867	29	71,7	GGCTTCTGGCTGGATGGCGAAATCTTCGG
QC RRRRR-F	8	88	34	79,1	GGCTTCTGGCTGCGCCGCCGATCTTCGGTGACG
QC RRRRR-R	4,6	51	34	79,1	CGTCACCGAAGATGCGGCCGCGCAGCCAGAAGCC
QC QRREE-F	10	91	28	76,3	CGCTTCCACGAGCCAACCTGGGCTGC
QC QRREE-R	8,4	76	28	76,3	GCGCAGGCCAGTTCGCTCGTGAAGCG
QC RQREE-F	10,1	98	30	68,7	CTTCAACTTCAAGCAACGTTCCACCGTGAG
QC RQREE-R	7,8	76	30	68,7	CTCACGGTGGAACTGCTTGAAGTTGAAG
QC RRQEE-F	9,5	93	30	68,7	GACAACGGCATCCAAGCTAACCACTGATC
QC RRQEE-R	10,9	106	30	68,7	GATCAGGTTGTTAGCTTGATGCCGTTGTC

7.3 Verwendete Puffer und Lösungen

[4.1]

B1	0,5% TWEEN-20, 0,5% Triton X-100, 0,2 mg/ml RNaseA, 50 mM Tris/HCl pH8,0
B2	3 M Guanidiniumchlorid, 20% TWEEN-20
QBT	50 mM MOPS/HCl pH7,0, 0,75 M NaCl, 15% Isopropanol, 1,5% TritonX-100
QC	50 mM MOPS/HCl pH7,0, 1 M NaCl, 15% Isopropanol
QF	50 mM Tris/HCl pH8,5, 1,25 M NaCl, 15% Isopropanol
TE	10 mM Tris/HCl pH8, 0,1 mM EDTA
TAE	2 mM EDTA, 20 mM Natriumacetat, 40 mM Tris/HCl pH8,0
6x Ladepuffer DNA	12% Ficoll 400, 60 mM EDTA pH8,0, 0,6% SDS, 0,15% Bromphenolblau, 0,15% Xylencyanol
LB-Medium	1% bacto tryptone, 0,5% bacto yeast extract, 1% NaCl
LB-Agar	LB-Medium, 1,5% bacto agar

[4.4]

6x Ladepuffer SDS	0,3 M Tris/HCl pH6,8, 30% Glyzerin, 10% SDS, 0,0012 % Bromphenolblau
10x Trenngelpuffer	3 M Tris/HCl pH8,8, 0,5% SDS
10x Sammelgelpuffer	1,25 M Tris/HCl pH6,8, 1% SDS
10x Elektrophoresepuffer	1 % (w/v) SDS, 2,5 M Glycin, 0,25 M Tris/HCl pH8,3
Färbelösung Coomassie	8% (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1,6% H ₃ PO ₄ , 20% MeOH, 0,04% Coomassie G250
Fixierlösung Silber	50% MeOH, 12% HAc
Silberlösung	2g/l AgNO ₃ , 375 µl/l Formaldehyd
Färbelösung Silber	60 g/l Na ₂ CO ₃ , 5 mg/l Na ₂ SO ₃ , 250 µl/l Formaldehyd

[4.5]

Aufschluss-Puffer	50 mM Tris/HCl pH8,7, 150 mM NaCl
10x IB-Waschpuffer	10% N-Lauryl-Sarkosin, 0,5% TritonX-100
Laufpuffer Gelchromatographien	0,3% OPOE, 36,5 mM NaCl, 12,5 mM Na _x H _y PO ₄ pH7,2

[4.6]

Rückfaltungspuffer SDS	25 mM Phosphat-Puffer pH7,2, 1% OPOE
Dialysenpuffer	0,3% OPOE, 25 mM Na _x H _{3-x} PO ₄ pH8,0, 50 mM NaCl

[4.7]

Waschpuffer Malatbindungstest	50 mM Tris/HCl pH8,0, 1% OPOE, 50 mM NaCl
--------------------------------------	---

7.4 Verwendete Geräte

Gerät

Agarose Gel Photographiereinrichtung Image Reader

Agarose Gelelektrophorese-Apparatur

Autoklav

Blockthermostat BT200

Brutschrank

Celldisrupter EmulsiFlex-C5

Chromatographieapparaturen:

ÄKTA™-System

SMART-HPLC-System

Chromatographiesäulen:

Gelfiltrationssäule Superose 6 PC 3.2/60

Gelfiltrationssäule Spdex200 PC 3.2/60

Gelfiltrationssäule HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade

Dialyseschlauch:

12-16 kDa, Membran Typ36

3,5 kDa, Snakeskin

Eismaschine

Entgas-Apparatur für Puffer

Filterpapier (Radiokivitätsassay)

Fluorometer: Luminescence Spectrometer LS 50 B

FoldIt Kit

FTIR-Gerät: 740 FTIR Spectrometer

Konzentratoren: Microsep 3,5 ml, 3K

Küvetten, Quarz Typ Nr. 105.251 –QS

Magnetrührer Ika-combimag RCT

Mikrowelle Micromat

MilliQ PLUS Ultra Pure Water System

MinifoldI DotBlot System

Nitrocellulosemembran Protran BA-S 85

PCR-Reaktionsgefäße MicroAmp

PCR-Thermocycler PCR System 2400

pH-Meter pH525

Firma

Herolab

MPI Werkstatt

Tecnomara

Kleinfeld Labortechnik

Heraeus

Avestin

Amersham Pharmacia

Amersham Pharmacia

Amersham Pharmacia

Amersham Pharmacia

Amersham Pharmacia

Biomol

Amersham Pharmacia

Ziegra

Nalgene

Whatman

Perkin Elmer

Hampton Research

Nicolet

Pall Filtron

HELLMA

Ika Labortechnik

AEG

Millipore

Schleicher & Schüll

Schleicher & Schüll

Applied Biosystems

Perkin Elmer

WTW

Peltier Element PTP6	Perkin Elmer
Peristaltikpumpe EconoPump	BioRad
Pipetman 10, 20, 1000 µL	Gilson
Polyacrylamid Gelelektrophorese-Zubehör:	
Elektrophoreseapparatur und Gießkammer (12x10 cm)	MPI Werkstatt
Gelschüttler Unimax 2010	Heidolph
Geltrockner GelAir Dryer mit Cellophan-Folien	BioRad
Spannungsquelle PowerPak 300	BioRad
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 mL	Eppendorf
Schüttler:	
Cellstar	Nunc
Innova 3000	New Brunswick Scientific
Thermomixer 5436	Eppendorf
Sicherheitswerkbank antair BSK	GLW
Szintillationszähler: 1500 Tricard	Packard
Ultraschall-Zellaufschluss Sonifier 250	Branson
UV/Vis Spektrometer Lambda 40	Perkin Elmer
UV-Transilluminator	Herolab
Vakuum-Konzentrator BA-VC-300 H	Bachhofer GmbH
Vortex Genie 2	Bender&Hobein
Waage	Santorius
Wasserbad MT/2	Lauda
Zentrifugen:	
Avanti J25, Zentrifugenrotor JA-10 und JA-25.5	Beckmann
Rotanta 46 RS	Hettich
5417R, Zentrifugenrotor F 45-30-11	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen 15 mL und 50 mL Gamma sterilisiert	TPP

7.5 Verwendete Chemikalien und Enzyme

<i>Chemikalie</i>	<i>Anmerkungen</i>	<i>Firma</i>
ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit		Applied Biosystems
Acrylamid 30%/Bisacrylamid 0,8% Protogel Ultra Pure		National Diagnostics
Agarose		Sigma
Altered Sites® II-Ex1 in vitro Mutagenesis System		Promega
Ammoniumperoxydisulfat	APS	Merck
Ammoniumsulfat		Merck
Antibiotika		
Ampicillin	Endkonzentration 100 µg/ml	Sigma
Tetracyclin	Endkonzentration 5 µg/ml	Sigma
Kanamycin	Endkonzentration 25 µg/ml	Sigma
Chloramphenicol	Endkonzentration 34 µg/ml	Sigma
Bacto Agar		DIFCO
Bacto Tryptone		DIFCO
Bacto Yeast Extract		DIFCO
Bovine Serum Albumin	BSA	Sigma
Bradford Protein Assay		BioRad
Bromphenolblau		Serva
Bromphenolblau		Merck
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	Merck
Complete EDTA free Proteaseinhibitorcocktail		Roche
Coomassie Brilliant Blue R250		Serva
Desoxyribonuklease I	DNase	Sigma
Detergenzien:		
CHAPS	CHAPS	Sigma
n-Dodecyl-β-D-Maltosid	DDM	Sigma
n-Lauryldimethylaminoxid	LDAO	Fluka
n-Laurylsarkosin		Sigma
n-Octylpentaoxyethylen	C ₈ E ₅	Bachem
n-Octylpolyoxyethylen	OPOE	Bachem
n-Octyltetraoxyethylen	C ₈ E ₄	Bachem
n-Octyl-β-D-Glucosid	OG	Bachem
n-Octyl-β-D-Thioglucopyranosid	OTGP	Sigma
TritonX-100		Sigma
Tween 20		Fluka
Zwittergent3-14		Sigma
Dimethylsulfoxid	DMSO	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HP0 ₄	Merck
Essigsäure, konz.		Merck
Ethanol abs.	EtOH	Merck
Ethidiumbromid		Merck
Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure	EDTA	Merck

Gel Extraction Kit		Qiagen
Genomic DNA Kit		Qiagen
Glycerin 86-88%		Merck
Guanidiniumchlorid	GuaHCl	Merck
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranoside	IPTG	Biomol
Lysozym		Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Merck
Methanol	MeOH	Merck
MicroSpin™ G-50 Columns		Amersham Pharmacia
Molekulargewichtsmarker		
100 bp DNA Ladder		MBI Fermentas
λ /BstEII DNA Ladder		MBI Fermentas
1 kb DNA Ladder		GibcoBRL
Bench Mark™ Protein Ladder		GibcoBRL
SeeBlue™ Protein Ladder		Invitrogen
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin	TEMED	Serva
Natriumacetat		Merck
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	Merck
Natriumdodecylsulfat	SDS	Roth
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	Merck
Natriumhydroxid	NaOH	Merck
Proteinase K		Roche
QIAprep Spin Miniprep Kit		Qiagen
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit		Stratagene
Restriktionsendonukleasen		New England Biolabs
Rotiszint eco plus		Roth
Salzsäure, konz.	HCl	Merck
Trichloressigsäure	TCA	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	Riedel de Haen
Vektoren:		
pALTER-EXI		Promega
pBAD-TOPO		Invitrogen
pET17b		Novagen
pUC18		
Walker Kit		Invitrogen
Xylencyanol		Sigma

8 Literatur

- ¹ Nikaido, H., and Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**, 1-32
- ² Vaara, M., and Vaara, T. (1993). Ability of cecropin B to penetrate the enterobacterial outer membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2498-2501
- ³ Hancock, R.E.W., Karunaratne, D.N., and Bernegger-Egli, C. (1994). Molecular organization and structural role of the outer membrane macromolecules. In: Ghuysen, J.M. and Hagenbeck, R., editors. Bacterial cell wall. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Niederlande. 263-279
- ⁴ Schulz, G., (2003). Transmembrane β -Barrel Proteins. *Adv. Prot. Chem.* **63**, 47-70
- ⁵ Baumann, U. Wu, S., Flaherty, K.M. and McKay, D.B. (1993). 3-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa* – a two-dimensional protein with a calcium binding parallel-beta roll motif. *EMBO J.* **12**, 3357-3364
- ⁶ Birktoft, J.J., and Blow, D.M. (1972). Structure of crystalline α -chymotrypsin *J. Mol. Biol.* **68**, 187-240
- ⁷ Hendrickson, W.A., Pähler, A., Smith, J.L., Satow, Y., Merritt, E.A., and Phizackerley, R.P. (1989). Crystal structure of core streptavidin determined from multi-wavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 2190-2194
- ⁸ Schmid, B., Krömer, M., and Schulz, G.E. (1996). Expression of porin from *Rhodopseudomonas blastica* in *Escherichia coli* Inclusion-Bodies and folding into exact native structure. *FEBS Lett.* **381**, 111-111
- ⁹ Baldermann, C., Lupas, A., Lubieniecki, J., and Engelhardt, H. (1998). The regulated outer membrane protein Omp21 from *Delftia acidovorans* is identified as a member of a new family of eight-stranded β -sheet proteins by its sequence and properties. *J. Bac.* **180**, 3741-3749
- ¹⁰ Vogt, J., and Schulz, G.E. (1999). The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure* **7**, 1301-1309

-
- ¹¹ Pautsch, A., and Schulz, G.E. (1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1013-1017
- ¹² Pautsch, A., and Schulz, G.E. (2000). High-resolution structure of the OmpA membrane domain. *J. Mol. Biol.* **298**, 273-282
- ¹³ Morona, R., Klose, M., and Henning, U. (1984). *Escherichia coli* K-12 outer membrane protein (OmpA) as a bacteriophage receptor: analysis of mutant genes expressing altered proteins. *J. Bacteriol.* **159**, 570-578
- ¹⁴ Arora, A., Rinehart, D., Szabo, G., and Tamm, L.K. (2000). Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **275**, 1594-600
- ¹⁵ Vandeputte-Rutten, L., Kramer, R.A., Kroon, J., Dekker, N., Egmond, M.R., and Gros, P. (2001). Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *EMBO J.* **20**, 5033-5039
- ¹⁶ Snijder, H.J., Ubarretxena-Belandia, I., Blaauw, M., Kalk, K.H., Verhij, H.M., Egmond, M.R., Dekker, N., and Dijkstra, B.W. (1999). Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* **401**, 717-721
- ¹⁷ Koronakis V., Sharff A., Koronakis E., Luisi B., and Hughes C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein ToOC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**, 914-919
- ¹⁸ Weiss, M.S., Wacker, T., Weckesser, J., Welte, W., and Schulz, G.E. (1990). The three-dimensional structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 3Å resolution. *FEBS Lett.* **267**, 268-272
- ¹⁹ Weiss, M.S., and Schulz, G.E. (1992). Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227**, 493-509
- ²⁰ Garavito, R.M., and Rosenbusch, J.P. (1980). Three-dimensional crystals of an integral membrane protein: an initial X-ray analysis. *J. Cell Biol.* **86**, 327-329
- ²¹ Koebnik, R., Locher, K.P., and Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology.* **37**, 239-53

-
- ²² Schirmer, T., and Cowan, S.W. (1993). Prediction of membrane-spanning β -strands and its application to maltoporin. *Prot. Sci.* **2**, 1361-1363
- ²³ Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F., and Rosenbusch, J.P. (1995). Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**, 512-514
- ²⁴ Forst, D., Welte, W., Wacker, T. and Diederichs, K. (1998). Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 37-46
- ²⁵ Meyer, J.E.W., Hofnung, M., and Schulz, G.E. (1997). Structure of maltoporin from *Salmonella typhimurium* ligated with a nitrophenyl-maltotrioxide. *J. Mol. Biol.* **266**, 761-775
- ²⁶ Ulmke, D., Kreth, J., Lengeler, J.W., Welte, W., and Schmid, T. (1999). Site-directed mutagenesis of loop L3 of sucrose porin ScrY leads to changes in substrate selectivity. *J. Bacteriol.* **181**, 1920-1923
- ²⁷ Dumas, F., Koebnik, R., Winterhalter, M., and Van Gelder, P. (2000). Sugar transport through maltoporin of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 19747-19751
- ²⁸ Meyer, J.E.W., and Schulz, G.E. (1997). Energy profile of maltooligosaccharide permeation through maltoporin as derived from the structure and from a statistical analysis of saccharide-protein interactions. *Protein Sci.* **6**, 1084-1091
- ²⁹ Schirmer, T., and Phale, P.S. (1999). Brownian dynamics simulation of ion flow through porin channels. *J. Mol. Biol.* **294**, 1159-1167
- ³⁰ Locher, K.P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch J.P., and Moras, D. (1998). Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: Crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**, 771-778
- ³¹ Buchanan, S.K. Smith, B.S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D., and Deisenhofer J. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 56-63
- ³² Braun, V., and Braun, M. (2002). Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Letters.* **529**, 78-85

-
- ³³ Rutz, J.M., Liu, J., Lyons, A.J., Goranson, J., Armstrong, S.K., McIntosh, M.A., Feix, J.B., and Klebba, P.E. (1992). Formation of a gated channel by a ligand-specific transport protein in the bacterial outer membrane. *Science* **258**, 471-475
- ³⁴ Larsen, R.A., Thomas, M.G., and Postle, K. (1999). Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.* **31**, 1809-1824
- ³⁵ Gerbl-Rieger, S., Engelhardt, H., Peters, J., Kehl, M., Lottspeich, F., and Baumeister, W. (1992). Topology of the anion-selective porin Omp32 from *Comamonas acidovorans*. *J. Struct. Biol.* **108**, 14-24
- ³⁶ Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Chakraborty, S., and Sly L.I. (1999). Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren, de Jong, 1926 and Tamaoka et al. 1987), *Internat. J. System. Bact.* **49**, 567-76
- ³⁷ Bofill, L., Wessolossky, M., Vicent, E., Salas, M., Besso, J., Merentes, A., Isturiz, R., Guzman, M., and Murillo, J. (1996). Septic shock due to *Delftia acidovorans* – a most unusual association. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **5**, 73-74
- ³⁸ Willems, A., de vos, P., and de Ley, J. (1992) The genus *Delftia*: in: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer, editors. *The prokaryotes*. Third edition. Springer-Verlag, New York, NY, USA. 2583-2590
- ³⁹ Gerbl-Rieger, S. (1990) Doktorarbeit, Technische Universität München
- ⁴⁰ Mathes, A., and Engelhardt, H. (1998). Nonlinear and asymmetric open channel characteristics of an ion-selective porin in planar membranes. *Biophys. J.* **75**, 1255-1262
- ⁴¹ Phale, P.S., Phillipsen, A., Kiefhaber, T., Koebnik, R., Phale, V.P., Schirmer, T. and Rosenbusch, J.P. (1998) Stability of trimeric OmpF porin: contributions of the latching loop L2. *Biochemistry* **37**, 15663-15670
- ⁴² Robertson, K.M., and Tieleman, D.P. (2002). Orientation and interactions of dipolar molecules during transport through OmpF porin. *FEBS Lett.* **528**, 53-57
- ⁴³ Brunen, M., and Engelhardt, H. (1995). Significance of positively charged amino acids for the function of the *Acidovorax delafieldii* porin Omp34. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 127-132

-
- ⁴⁴ Watanabe, M., Rosenbusch, J., Schirmer, T., and Karplus, M. (1997). Computer simulations of the OmpF porin from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* **72**, 2094-2103
- ⁴⁵ Björkstén, J., Soares, C.M., Nilsson, O., and Tapia, O. (1994). On the stability and plastic properties of the interior loop L3 in *Rhodobacter capsulatus* porin – a molecular dynamics study. *Protein Eng.* **7**, 487-494
- ⁴⁶ Saxena, K., Drosou, V., Maier, E., Benz, R., and Ludwig, B. (1999). Ion selectivity reversal and induction of voltage-gating by site-directed mutations in the *Paracoccus denitrificans* porin. *Biochemistry* **38**, 2206-2212
- ⁴⁷ Vangelder, P., Saint, N., van Boxtel, R., and Tommassen, J. (1997). Pore functioning of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* – mutagenesis of the constriction loop L3. *Protein Eng.* **10**, 699-706
- ⁴⁸ Sen, K., Hellmann, J., and Nikaido, H. (1988). Porin channels in intact cells of *Escherichia coli* are not affected by Donnan potentials across the outer membrane. *J. Biol. Chem.* **263**, 1182-1187
- ⁴⁹ Zeth, K., Diederichs, K., Welte, W., and Engelhardt, H. (2000). Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from *Delftia acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution. *Structure* **8**, 991-999
- ⁵⁰ Zachariae, U. (2004) Doktorarbeit, Technische Universität München
- ⁵¹ Zachariae, U., Koumanov, A., Engelhardt, H., and Karshikoff, A. (2002). Electrostatic properties of the anion selective porin Omp32 from *Delftia acidovorans* and of the arginine cluster of bacterial porins. *Protein Sci.* **11**, 1309-1319
- ⁵² Zachariae, U., Helms, V., and Engelhardt, H. (2003) Multistep mechanism of chloride translocation in a strongly anion-selective porin channel. *Biophys. J.* **85**, 954-962
- ⁵³ Phale, P.S., Philippsen, A., Widmer, C., Phale, V.P., Rosenbusch, J.P., and Schirmer T. (2001). Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation. *Biochem.* **40**, 6319-6325
- ⁵⁴ Koebnik, R. (1995). Proposal for a peptidoglycan associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins. *Mol. Microbiol.* **16**, 1269-1270

-
- ⁵⁵ Braun, V., and Bosch, V. (1972) Sequence of the murein-lipoprotein and the attachment site of the lipid. *Eur. J. Biochem.* **28**, 51-69
- ⁵⁶ Lazzaroni, J.C., and Portalier, R. (1992) The excC gene of *Escherichia coli* K-12 required for cell envelope integrity encodes the peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL). *Mol. Microbiol.* **6**, 735-742
- ⁵⁷ Wang, Y. (2002). The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys. Res. Comm.* **292**, 396-401
- ⁵⁸ Beher, M.G. Schnaitmann, C.A., and Pugsley, A.P. (1980) Major heat-modifiable outer membrane protein in gram-negative bacteria: a comparison with the OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **143**, 906-913
- ⁵⁹ Gotoh, N., Wakebe, H., Yoshihara, E., Nakae, T., and Nishino, T. (1989) Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *J. Bacteriol.* **171**, 983-990
- ⁶⁰ Neumann, U., Schiltz, E., Stahl, B., Hillenkamp, F., and Weckesser, J. (1996). A peptidoglycan binding domain in the porin-associated protein (PAP) of *Rhodospirillum rubrum* FR1. *FEMS Microbiol.Lett.* **138**, 55-68
- ⁶¹ Neumann, U., Benz, R., Rosenbusch, J.P., Stahl, B., and Weckesser, J. (1995) Porin and Porin-associated protein (PAP) of *Rhodospirillum rubrum* FR1. *Microbiol.* **141**, 3155-3160
- ⁶² De Mot, R., and VanderLeyden, J. (1994). The C-terminal conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* **12**, 333-334
- ⁶³ Wetzler, L.M., Gotschlich, E.C., Blake, M.S., and Koomey, J.M. (1989) The construction and characterization of *Neisseria gonorrhoeae* lacking protein III in its outer membrane. *J. Exp. Med.* **169**, 2199-2209
- ⁶⁴ Zeth, K. (2000) Doktorarbeit, Technische Universität München
- ⁶⁵ Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J. and Boucher, C.A. (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**, 497-502

-
- ⁶⁶ Klugman, K.P., Gotschlich, E.C. and Blake, M.S. (1989) Sequence of the structural gene (*rmpM*) for the class 4 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*, homology of the protein to gonococcal protein III and *Escherichia coli* OmpA, and construction of meningococcal strains that lack class 4 protein. *Infect. Immun.* **57**, 2066-2071
- ⁶⁷ Promega (2001). Life Science Catalog. Seiten 18.12-18.14
- ⁶⁸ Novagen (2002). Novagen Catalog. Seiten 272-273
- ⁶⁹ Schoepfer R. (1993). The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. *Gene.* **124**, 83-85
- ⁷⁰ Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 615-619
- ⁷¹ Nelson, M., and McClelland, M. (1992). Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Meth. in Enzym.* **216**, 279-303
- ⁷² Baldermann, C. (2000) Doktorarbeit, Technische Universität München
- ⁷³ Gill, S.G., and von Hippel, P. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326
- ⁷⁴ Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685
- ⁷⁵ Andrade, M.A., P. Chacón, J.J. Merelo and F. Morán. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. *Prot. Eng.* **6**, 383-390
- ⁷⁶ Mathes, A. (1999) Doktorarbeit, Technische Universität München
- ⁷⁷ Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M.C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modelling server. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3381-3385

-
- ⁷⁸ Bates, P.A. and Sternberg, M.J.E. (1999) Model Building by Comparison at CASP3: Using Expert Knowledge and Computer Automation. *Proteins* **3**, 47-54
- ⁷⁹ Lambert, C., Leonard, N., De Bolle, X., and Depiereux, E. (2002) EsysPred3D : Prediction of proteins 3D structure. *Bioinf.* **18**, 1250-1256
- ⁸⁰ Combet, C., Jambon, M., Deléage, G., and Geourjon, C. (2002). Geno3D: Automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinf.* **18**, 213-214
- ⁸¹ Prilipov, A., Phale, P.S., Vangelder, P., Rosenbusch, J.P., and Koebnik R. (1998). Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression – large scale production of mutant porins from *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters*. **163**, 65-72
- ⁸² Grizot, S., and Buchanan, S.K. (2004). Structure of the OmpA-like domain of RmpM from *Neisseria meningitidis*. *Molec. Microbiol.* **51**, 1027-1037
- ⁸³ Newton, C.R., and Graham, A. (1997) PCR, in: Billington, D., editor. Introduction to Biotechniques. Second edition. Springer-Verlag, New York, NY, USA. 9-12
- ⁸⁴ Kidd, K.K., and Ruano, G. (1995) Optimizing PCR, in: McPherson, M.J., Hames, B.D., and Taylor, G.R., editors. PCR 2, a practical approach. IRL Press at Oxford university press. Oxford, GB. 65-68
- ⁸⁵ Oste, C.C. (1994) PCR Instrumentation: Where do we stand?, in: Mullis, K.B., Ferré, F., and Gibbs, R.A., editors. The polymerase chain reaction. Birkhäuser, Boston, USA. 167-173
- ⁸⁶ Kane J.F. (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Op. Biotechn.* **6**, 494-500
- ⁸⁷ Gerbl-Rieger, S. (1990) Doktorarbeit, Technische Universität München
- ⁸⁸ Shang, E.S., Exner, M.M., Summers, T.A., Martinich, C., Champion, C.I., Hancock, R.E. and Haake, D.A. (1995) The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infection & Immunity*. **63**, 3174-3181
- ⁸⁹ Ghosh, R., Steiert, M., Hardmeyer, A., Wang, Y.F., and Rosenbusch, J.P. (1998) Overexpression of outer membrane porins in *E. coli* using pBluescript-derived vectors. *Gene Expr.* **7**, 149-161, 1998

-
- ⁹⁰ Huang, H., Jeanteur, D., Pattus, F., and Hancock, R.E. (1995) Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD. *Mol. Microbiol.* **16**, 931-941
- ⁹¹ Miroux, B., and Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289-298
- ⁹² Fahnert, B., Lilie, H., and Neubauer P. (2004) Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv. Biochem. Eng.-Biotech.* **89**, 93-142
- ⁹³ Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Golobinoff, P., and Bukau, B. (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol. Microbiol.* **40**, 397-413
- ⁹⁴ Rosen, R., Biran, D., Gur, E., Becher, D., Hecker, M., and Ron, E.Z. (2001) Protein aggregation in *Escherichia coli*: Role of proteases. *FEMS Microbiol. Letts.* **207**, 9-12
- ⁹⁵ Ellis RJ. (1997) Molecular chaperones: avoiding the crowd. *Curr. Biol.* **7**, R531-R533
- ⁹⁶ Minton, A.P. (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr. Op. Struct. Biol.* **10**, 34-39
- ⁹⁷ Maurizi, M.R. (1992) Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia* **48**, 178-201
- ⁹⁸ Goldberg, A.L., and St. John, A.C. (1976) Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2: *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 747-803
- ⁹⁹ Hagel, P., Gerding, J.J.t., Fieggen, W., and Bloemendal, H. (1971) Cyanate formation in solutions with urea. I. Calculation of cyanate concentration at different temperature and pH. *Biochem. Biophys. A.* **243**, 366-372
- ¹⁰⁰ Eisele, J.L., and Rosenbusch, J.P. (1990) In vitro folding and oligomerization of a membrane protein. Transition of bacterial porin from random coil to native conformation. *J. Biol. Chem.* **265**, 10217-10220
- ¹⁰¹ Pautsch, A., Vogt, J., Model, K., Siebold, C., and Schulz, G.E. (1999) Strategy for membrane protein crystallization exemplified with OmpA and OmpX. *Proteins.* **34**, 167-172

-
- ¹⁰² Arakawa, T., and Tsumoto, K. (2003) The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochem. & Biophys. Res. Com.* **304**, 148-152
- ¹⁰³ Mayer, M., and Buchner, J. (2004) Refolding of inclusion body proteins. *Meth. in Mol. Med.* **94**, 239-254
- ¹⁰⁴ Surrey, T., Schmid, A., and Jähnig, F. (1996) Folding and membrane insertion of the trimeric β -barrel protein OmpF. *Biochem.* **35**, 2283-2288
- ¹⁰⁵ Kleinschmidt, J.H., Wiener, M.C., and Tamm, L.K. (1999) Outer membrane protein A of *E. coli* folds into detergent micelles, but not in the presence of monomeric detergent. *Prot. Sci.* **8**, 2065-2071
- ¹⁰⁶ Dornmair, K., Kiefer, H., and Jahnig, F. (1990) Refolding of an integral membrane protein. OmpA of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 18907-18911
- ¹⁰⁷ Prince, S.M., Feron, C., Janssens, D., Lobet, Y., Achtman, M., Kusecek, B., Bullough, P.A., and Derrick, J.P. (2001) Expression, refolding and crystallization of the OpcA invasin from *Neisseria meningitidis*. *Acta Cryst. Sect. D.* **57**, 1164-1166
- ¹⁰⁸ Minetti, C.A.S.A., Tai, J.Y., Blake, M.S., Pullen, J.K., Liang, S.M., and Remeta, D.P. Structural and functional characterization of a recombinant PorB class 2 protein from *Neisseria meningitidis*. Conformational stability and porin activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 10710-10720
- ¹⁰⁹ Rudolph, R., and Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56
- ¹¹⁰ Buchanan, S.K. (1999) β -barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr. Op. Struct. Biol.* **9**, 455-461
- ¹¹¹ Van Gelder, P., De Cock, H., and Tommassen, J. (1994) Detergent-induced folding of the outer-membrane protein PhoE, a pore protein induced by phosphate limitation. *Eur. J. Biochem.* **226**, 783-787
- ¹¹² Watanabe, Y. (2002) Effect of various mild surfactants on the reassembly of an oligomeric integral membrane protein OmpF porin. *J. Prot. Chem.* **21**, 169-175
- ¹¹³ Markovic-Housley, Z., and Garavito, R.M. (1986) Effect of temperature and low pH on structure and stability of matrix porin in micellar detergent solutions. *Biochim. Biophys. A.* **869**, 158-170

-
- ¹¹⁴ Dahan, D., Srikumar, R., Laprade, R., and Coulton, J.W. (1996) Purification and refolding of recombinant *Haemophilus influenzae* type b porin produced in *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters* **392**, 304-308
- ¹¹⁵ Pullen, J.K., Liang, S.M., Blake, M.S., Maters, S., and Tai, J.Y. (1995) Production of *Haemophilus influenzae* type-b porin in *Escherichia coli* and its folding into the trimeric form. *Gene* **152**, 85-88
- ¹¹⁶ Bogdanov, M., and Dowhan, W. (1999) Lipid-assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* **274**, 36827-36830
- ¹¹⁷ Bogdanov, M., Umeda, M., and Dowhan W. (1999) Phospholipid-assisted refolding of an integral membrane protein. Minimum structural features for phosphatidylethanolamine to act as a molecular chaperone. *J. Biol. Chem.* **274**, 12339-12345
- ¹¹⁸ Bogdanov, M., Sun, J., Kaback, H.R., and Dowhan W. (1996) A phospholipid acts as a chaperone in assembly of a membrane transport protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 11615-11618
- ¹¹⁹ Benz, R., Schmid, A., Nakae, T., and Vos-Scheperkeuter, G.H. (1986) Pore formation by LamB of *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes. *J. Bac.* **165**, 978-986
- ¹²⁰ Schulein, K., Schmid, K., and Benzl, R. (1991) The sugar-specific outer membrane channel ScrY contains functional characteristics of general diffusion pores and substrate-specific porins. *Mol. Microbiol.* **5**, 2233-2241
- ¹²¹ Saint, N., Lou, K.L., Widmer, C., Luckey, M., Schirmer, T., and Rosenbusch, J.P. (1996) Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. II. Functional characterization. *J. Biol. Chem.* **271**, 20676-20680
- ¹²² Benz, R., Schmid, A., Hancock, R.E. (1985) Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *J. Bac.* **162**, 722-727
- ¹²³ Dargent, B., Hofmann, W., Pattus, F., and Rosenbusch, J.P. (1986) The selectivity filter of voltage-dependent channels formed by phosphoporin (PhoE protein) from *E. coli*. *EMBO.* **5**, 773-778
- ¹²⁴ Klebba, P.E. (2002) Mechanism of maltodextrin transport through LamB. *Res. in Microbiol.* **153**, 417-424

-
- ¹²⁵ Van Gelder, P., Dumas, F., Bartoldus, I., Saint, N., Prilipov, A., Winterhalter, M., Wang, Y., Philippsen, A., Rosenbusch, J.P., and Schirmer, T. (2002) Sugar transport through maltoporin of *Escherichia coli*: role of the greasy slide. *J. Bac.* **184**, 2994-2999
- ¹²⁶ Kim, B.H., Andersen, C., Kreth, J., Ulmke, C., Schmid, K., and Benz R. (2002) Site-directed mutagenesis within the central constriction site of ScrY (sucroseporin): effect on ion transport and comparison of maltooligosaccharide binding to LamB of *Escherichia coli*. *J. Membr. Biol.* **187**, 239-253
- ¹²⁷ Charbit, A. (2003) Maltodextrin transport through lamb. *Front. in Biosci.* **8**, 265-274
- ¹²⁸ Jansen, C., Wiese, A., Reubsæet, L., Dekker, N., de Cock, H., Seydel, U., and Tommassen, J. (2000) Biochemical and biophysical characterization of in vitro folded outer membrane porin PorA of *Neisseria meningitidis*. *Biochim. Biophys. A.* **1464**, 284-298
- ¹²⁹ Sugawara E. Nikaido H. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 2507-2511
- ¹³⁰ Cascales, E., Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.C., and Lloubes, R. (2002) PAL lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J. Bact.* **184**, 754-759
- ¹³¹ Chook, Y.M., Gray, J.V., Ke, H., and Lipscomb, W.N. (1994) The monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis*. Structure determination of chorismate mutase and its complexes with a transition state analog and prephenate, and implications for the mechanism of the enzymatic reaction. *J. Molec. Biol.* **240**, 476-500
- ¹³² Prinz, T., and Tommassen, J. (2000) Association of iron-regulated outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* with the RmpM (class 4) protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**, 49-53
- ¹³³ Bouveret E. Benedetti H. Rigal A. Loret E. Lazdunski C. (1999) In vitro characterization of peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL)-peptidoglycan and PAL-TolB interactions. *J. Bact.* **181**, 6306-6311
- ¹³⁴ Rigal A. Bouveret E. Lloubes R. Lazdunski C. Benedetti H. (1997) The TolB protein interacts with the porins of *Escherichia coli*. *J. Bact.* **179**, 7274-7279
- ¹³⁵ Mizuno T. (1981) A novel peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) found in the outer membrane of *Proteus mirabilis* and other Gram-negative bacteria. *J. Biochem.* **89**, 1039-1049