

**DNA-Bindung und Modifizierung der
DNA-bindenden Domäne des bakteriellen
Transkriptionsfaktors PhoB aus *E. coli***

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Organische und Bioorganische Chemie
der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Gesa Christine Niemann

Bielefeld, April 2014

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach DIN EN ISO 9706

Diese Arbeit erfolgte im Rahmen des Sonderforschungsbereiches SFB 613
Physik von Einzelmolekülprozessen und molekularer Erkennung in organischen Systemen
Teilprojekt K2 - Bindung von Peptiden und Peptidanaloga an DNA -

1. Gutachter:

Prof. Dr. Norbert Sewald

Organische und Bioorganische Chemie, Fakultät für Chemie

Universität Bielefeld

2. Gutachter:

Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard

Biochemie III, Fakultät für Chemie

Universität Bielefeld

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe

- **Organische Chemie und Bioorganische Chemie** -

an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald für das Überlassen des interessanten Forschungsthemas, für sein großes Vertrauen und seine stete Unterstützung. Ebenso bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die er für uns in seinem Labor geschaffen hat.

Frau Prof. Dr. G. Fischer von Mollard danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Der gesamten Arbeitsgruppe OCIII danke ich für das hervorragende Miteinander. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Markus Ritzefeld, nicht nur für die vielen wertvollen Diskussionen und dem konstruktiven Ideenaustausch, auch für die gewissenhafte Korrektur dieser Arbeit. Für letzteres danke ich auch Marcel Frese und Marcus Gerlach. Insgesamt war unser Biolabor-Team eine starke Gemeinschaft, in der großartig und strukturiert zusammengearbeitet wurde. Besonders Carmela Michalek möchte ich für die Unterstützung bei zahlreichen Expressionen und Aufreinigungen von PhoB meinen Dank ausdrücken.

Der Auszubildenden Birte Brosent und dem Bachelor-Studenten Christian Bartz danke ich für ihr großes Engagement und ihre Unterstützung.

Für andere Dinge, die nicht zum Laboralltag gehören, danke ich dem unschlagbaren Feierabend-Team der OCIII: Michaela, Tanja, Lilly, Michi, Ansgar und Felix. Zu diesen Dingen gehören Minimalgrillen bei jedem Wetter, Boßeln, interessante Musikvideos und sehr vieles mehr. Extrem wichtig waren auch all die kleinen „philosophischen“ Pausen mit Anke und Marco. Nicht nur für die schöne Zeit in Budapest bedanke ich mich bei Bianca und Sabrina.

Auch vielen ehemaligen Mitgliedern der OCIII danke ich, vornehmlich Dr. Jens Conradi für die vielen wertvollen Tipps und Diskussionen, Dr. Katrin Frese für die Einführung in die PhoB-Thematik und insbesondere Dr. Lilly Sicking für unsere freundschaftliche Verbindung und die exzellenten Anregungen abseits des Labors.

Privater Natur danke ich Antje und Tanja für die vergnüglichen, reitsportlichen Aktivitäten.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Vater Wilhelm, meinen Schwestern Anne und Holle, sowie Merle, Annelore und Tine für ihre konstante Unterstützung, Geduld und Liebe danken. Emmi wäre stolz auf uns...

“Sitt faste, kiek wiet un rög di!”

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Protein-DNA-Interaktionen	1
1.2. Der Transkriptionsfaktor PhoB	4
1.3. Die Transpeptidase Sortase A	10
1.3.1. Chemoselektive Protein-Modulation	15
1.3.2. Cyclische Proteine	21
2. Zielsetzung	25
3. Materialien	27
3.1. Geräte	27
3.2. Verbrauchsmaterialien	29
3.3. Chemikalien	29
3.4. Enzyme	30
3.5. Protein- und DNA-Standards	30
3.6. Kit-Systeme	30
3.7. Bakterienstämme	31
3.8. Expressionsvektoren	31
3.9. Oligonukleotide	32
3.10. Proteine und Peptide	33
3.11. Puffer und Medien	34
3.11.1. Bakterien Kultivierung.....	34
3.11.2. Gelelektrophorese	35
3.11.3. Proteinaufreinigung.....	36
3.11.4. CD-Messungen	37
3.11.5. SPR-Messungen	37
3.11.6. Sortase A-vermittelte Transpeptidierungen	37
3.11.7. Sonstige Puffer und Lösungen	38
3.12. Computersoftware	39

4. Methoden	41
4.1. Mikrobiologische Methoden	41
4.1.1. Kultivierung von Bakterien.....	41
4.1.2. Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen.....	41
4.1.3. Glycerinkulturen zur Lagerung von Bakterien.....	41
4.1.4. Herstellung kompetenter Bakterien	42
4.1.5. Transformation kompetenter Bakterien.....	42
4.1.6. Expression rekombinanter Proteine	43
4.2. Molekularbiologische Methoden	44
4.2.1. Präparation von Plasmid-DNA	44
4.2.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von DNA-Lösungen.....	44
4.2.3. Dimerisierung einzelsträngiger Oligonukleotide	44
4.2.4. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	45
4.2.5. Dephosphorylierung von DNA.....	45
4.2.6. Agarosegelelektrophorese von DNA	45
4.2.7. Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	46
4.2.8. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
4.2.9. Aufreinigung von PCR-Fragmenten.....	48
4.2.10. Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit Insert-DNA	48
4.2.11. Identifizierung von Mutanten per DNA-Sequenzierung.....	49
4.3. Biochemische Methoden	50
4.3.1. Aufschluss von Bakterienzellen (Zelllyse).....	50
4.3.2. Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	50
4.3.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	53
4.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE).....	53
4.3.5. Umpufferung von Proteinlösungen mittels Dialyse	54
4.3.6. Entsalzung von Proteinlösungen per ZipTip Spitzen	55
4.3.7. Aufkonzentrieren von Proteinlösungen mit dem Vivaspin-System.....	55
4.3.8. Tryptischer In-Gel-Verdau von Proteinen.....	56
4.3.9. Mikrowellenunterstützte Festphasen-Peptidsynthese (SPPS)	57
4.3.10. Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC).63	
4.3.11. Massenspektrometrische Analysen	65

4.4. Circular dichroismus (CD)	68
4.4.1. Bestimmung der Sekundärstrukturanteile von Proteinen	70
4.4.2. Analyse der Protein-DNA-Komplexbildung mittels CD.....	71
4.4.3. Bestimmung der thermischen Stabilität von Proteinen durch temperaturabhängige CD-Messungen.....	71
4.5. Oberflächenplasmonresonanz (SPR)	72
4.5.1. Immobilisierung des DNA-Liganden.....	74
4.5.2. SPR-Messung der Protein-DNA-Interaktion	75
4.5.3. Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D	76
4.6. Peptid- und Protein-Modifizierung mit Hilfe der Sortase A (SML)	78
4.6.1. Sortase A-Testreaktionen mit Peptiden.....	78
4.6.2. Sortase A-vermittelte Cyclisierung von Proteinen	79
4.6.3. Immobilisierung von Sortase A an Chitin-Beads	79
4.6.4. Ligation von Peptiden und Proteinen mittels immobilisierter Sortase A	80
5. Ergebnisse und Diskussion	81
5.1. Darstellung von PhoB^{DBD}-Proteinen	81
5.1.1. Herstellung von PhoB ^{DBD} -Protein Mutanten.....	81
5.1.2. Expression von PhoB ^{DBD} -Proteinen.....	83
5.1.3. Aufreinigung von PhoB ^{DBD} -Proteinen durch Intein-vermitteltes Proteinspleißen.....	85
5.2. DNA-Oligonukleotide für die Interaktions-analyse	87
5.3. Untersuchung der Struktur und DNA-Interaktionen der PhoB^{DBD}- Proteine mittels CD	88
5.3.1. Analyse der Protein-Sekundärstrukturen.....	88
5.3.3. Untersuchung der Protein-DNA-Komplexbildung	90
5.3.4. Temperaturabhängige CD-Messungen zur Analyse der thermischen Stabilität von PhoB ^{DBD} -Proteinen	94
5.4. Untersuchung der PhoB^{DBD}-DNA-Interaktion mittels SPR	97
5.4.1. Immobilisierung der Oligonukleotide.....	97
5.4.2. Messung der PhoB ^{DBD} -DNA-Interaktionen mittels SPR	98
5.4.3. Quantitative Bestimmung der DNA-Interaktion der PhoB ^{DBD} -Proteine.....	102

5.5. Sortase A-vermittelte Peptid-Ligation (SML)	112
5.5.1. Expression und Aufreinigung von SrtA _{Δ59}	112
5.5.2. Festphasenpeptidsynthese von Peptiden als Substrate für die SrtA _{Δ59} - vermittelte Transpeptidierung.....	115
5.5.3. Etablierung der SrtA _{Δ59} -vermittelten Transpeptidierung.....	116
5.6. Sortase A-vermittelte PhoB^{DBD}-Cyclisierung	124
5.6.1. Darstellung der bifunktionellen PhoB ^{DBD} -Mutante für die Cyclisierung.....	124
5.6.2. Srt _{Δ59} -vermittelte Cyclisierung von PhoB ^{DBD}	131
5.7. Transpeptidierung mittels immobilisierter Sortase A	141
5.7.1. Darstellung und Immobilisierung der SrtA _{Δ59} _CBD	141
5.7.2. Ligation von Peptiden mit immobilisierter SrtA _{Δ59} _CBD.....	144
5.7.3. Cyclisierung von PhoB ^{DBD} mit immobilisierter SrtA _{Δ59} _CBD	145
5.8. Zusammenfassung und Diskussion der Sortase A-vermittelten PhoB^{DBD}-Cyclisierung	148
6. Zusammenfassung	151
7. Abstract	154
8. Anhang	157
8.1. CD- und SPR-Spektren	157
8.2. Spektren und Daten der SML	159
8.3. Abbildungsverzeichnis.....	171
8.4. Tabellenverzeichnis.....	173
8.5. Abkürzungen.....	175
8.6. Aminosäuren.....	177
8.7. DNA- und Aminosäuresequenzen	178
8.8. Veröffentlichungen	180
8.9. Literaturverzeichnis.....	181

1. Einleitung

1.1. Protein-DNA-Interaktionen

Interaktionen zwischen Proteinen und DNA sind essentiell für die wichtigsten regulatorischen Prozesse in der Zelle, wie die Genexpression und die Replikation, die beide durch Protein-DNA-Wechselwirkungen kontrolliert werden. Die Adaption von Prokaryoten an veränderte Umweltbedingungen wird unter anderem durch die Biosynthese bestimmter Proteine mittels Protein-DNA-Interaktionen eingeleitet. Diese Proteine werden durch Transkription der entsprechenden Gene hergestellt, deren Expression per Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Diese Transkriptionsfaktoren sind regulatorische Proteine, die spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen binden und durch Wechselwirkungen mit der RNA-Polymerase die Transkription initiieren. Allgemein erfolgt die Interaktion von Proteinen mit DNA durch Kombination verschiedener Bindungsmechanismen. Ein Mechanismus wird als sogenannter *base readout* Mechanismus beschrieben, bei dem Proteine mithilfe von direkten spezifischen Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen oder durch nicht-polare Interaktionen mit der DNA interagieren. Demgegenüber steht der *shape readout* Mechanismus, welcher durch indirekte Wechselwirkungen seitens konformationeller oder dynamischer Charakteristika der DNA-Sequenz ausgezeichnet ist, die von Proteinen erkannt werden kann. [1]

Die direkten Interaktionen finden auf atomarem Level durch Wechselwirkungen zwischen einzelnen Aminosäureseitenketten der Proteine und den Oligonukleotiden der großen und kleinen Furche einer DNA statt. Die Wechselwirkungen werden durch Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und van der Waals-Interaktionen ausgebildet. [1,2] Dabei können Wasserstoffbrückenbindungen auch durch Wassermoleküle mediiert werden. [3] Betrachtet man die einzelnen Seitenketten, so zeigt sich, dass basische Aminosäuren wie Arginin und Lysin als Wasserstoffbrückenbindungs-Donoren eignen. Dagegen stehen saure Aminosäuren nur als Akzeptoren zur Verfügung. [4] Die Aminosäuren Threonin, Alanin, Glycin, Valin, Leucin und Isoleucin können van der Waals-Wechselwirkungen mit der DNA ausbilden. [4] Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin interagieren hydrophob durch Basenstapelwechselwirkungen mit den Nukleinbasen der DNA. [4] Cystein und Methionin zeigen selten Interaktionen. [4]

Insgesamt ist festzuhalten, dass die Interaktionen häufig mit dem Phosphat-Rückgrat, aber auch mit den Desoxyribosen oder den einzelnen DNA-Basen stattfinden können.

Auf makromolekularer Ebene erkennen und binden Proteine global veränderte DNA-Strukturen, zum Beispiel eine bestimmte Beugung der DNA-Struktur oder A- und Z-DNA Formen. Auch lokale Veränderungen wie DNA-Knicke oder verengte kleine Furchen führen zu dem sogenannten *shape readout* Mechanismus. [1,5] Die Basenpaare einer kleinen Furche (*minor groove*) sind nicht stark nach außen exponiert, wodurch kaum direkte Interaktionen mit den einzelnen Basen der DNA stattfinden. Durch bestimmte Sequenzabfolgen wird die Konformation der kleinen Furchen jedoch so variiert, dass sie ein verändertes lokales elektrostatisches Potential aufweist. So besitzen enge kleine Furchen ein stärkeres negatives elektrostatisches Potential, auf Grund dessen eine Interaktion mit Proteinoberflächen ermöglicht wird, die vermehrt positiv geladene Aminosäuren wie Arginin aufweisen. [5] Eine Übersicht über die Einteilung der Protein-DNA-Interaktionen ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

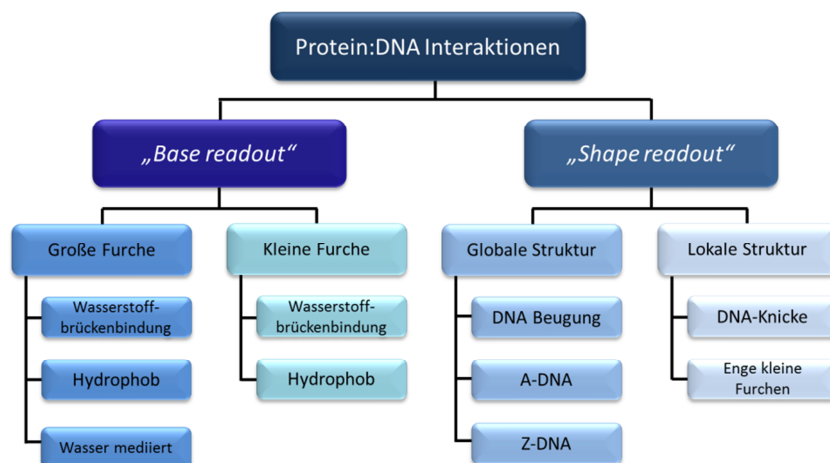


Abbildung 1.1: Mechanismen der Protein-DNA-Interaktionen

Typen der verschiedenen Protein-DNA-Interaktionsmechanismen. Es wird zwischen *base readout* und *shape readout* unterschieden, wobei *base readout* sich auf Interaktionen von Aminosäureseitenketten mit dem Phosphatrückgrat oder einzelnen Basen der DNA, der *shape readout* auf die globale und lokale DNA-Struktur bezieht. Darüber hinaus wird die Art der Interaktion in Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und durch Wasser mediierte Interaktionen unterteilt. Globale und lokale Strukturen werden unter anderem durch ihr elektrostatisches Potential erkannt [1,3]

Die Proteine, die mit der DNA interagieren, sind häufig regulatorische Proteine wie die Transkriptionsfaktoren, die die Transkription von Genen durch Polymerasen initiieren. Anhand von Röntgenstrukturanalysen und NMR-Studien konnten eine Vielzahl an unterschiedlichen Strukturmotiven für Transkriptionsfaktoren bestimmt und klassifiziert werden.^[6] Dabei stellte sich heraus, dass Aminosäuren mit einer hochspezifischen DNA-Interaktion innerhalb einer Proteinfamilie stark konserviert sind. Sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten sind Proteine mit einem *helix-turn-helix*-Motiv eine der am häufigsten vorkommenden Familie. Sie bestehen allgemein aus zwei α -Helices und einem β -Faltblatt. Charakteristisch ist hier die Erkennungshelix, die eine spezifische DNA-Sequenz in der großen Furche über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen bindet. Die zweite α -Helix stabilisiert dabei den Komplex.^[6] Eine Untergruppe dieser Familie sind die *winged-helix-turn-helix* Proteine, die aus drei α -Helices und einem antiparallelen β -Faltblatt bestehen. Zusätzlich zur Erkennungshelix interagiert in diesem Fall auch das β -Faltblatt mit der DNA.^[7] Eine weitere Familie sind die Zink koordinierenden *zinc-finger* Proteine, die häufig aus einer α -Helix und zwei antiparallelen β -Faltblättern bestehen und in Eukaryoten weit verbreitet sind. Diese Proteine werden durch ein Zink-Ion stabilisiert, welches durch konservierte Cystein- und Histidin-Seitenketten tetraedrisch koordiniert wird. Die DNA-Bindung erfolgt auch hier durch die α -Helix.^[8] Die *Leucin-Zipper* Proteine kommen nur in Eukaryoten vor und bestehen aus einer langen α -Helix mit hydrophoben Aminosäuren im C-terminus. Um an die DNA zu binden, dimerisieren zwei dieser Proteine unter Ausbildung eines *coiled-coil*, bei dem sich die Helices aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen umeinander winden. Die DNA-Bindung erfolgt durch basische Aminosäuren am N-terminus der α -Helix.^[9]

1.2. Der Transkriptionsfaktor PhoB

Der Transkriptionsfaktor PhoB aus *Escherichia coli* gehört zu den *winged-helix-turn-helix* Proteinen und wird in dieser Arbeit als Modell-Protein zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen verwendet. Er gehört zu der OmpR-PhoB Familie und ist Teil des Zweikomponenten-Regulationssystems PhoR/PhoB, welches die externe Phosphatkonzentration detektiert und die Anpassung zellulärer Prozesse auf einen Phosphat-Mangel reguliert. ^[10] Dieses System besteht aus der membranständigen Sensorkinase PhoR und dem PhoB-Protein, welches eine DNA-bindende Domäne (DBD) als Effektor und eine regulatorische Domäne (RD) besitzt. ^[11] Sinkt die Phosphatkonzentration im Periplasma, wird der Transkriptionsfaktor PhoB aktiviert indem die regulatorische Domäne durch die Sensorkinase PhoR phosphoryliert wird. Die Bindung des aktivierten Proteins erfolgt als Dimer über die DNA-Bindedomänen spezifisch an DNA-Sequenzen des Promotors, die in *pho*-Operons liegen. Anschließend wird die Transkription der entsprechenden Gene durch Rekrutierung der RNA-Polymerase induziert. Eine schematische Darstellung der Transkriptionsaktivierung durch PhoB ist in der Abbildung 1.2 dargestellt.

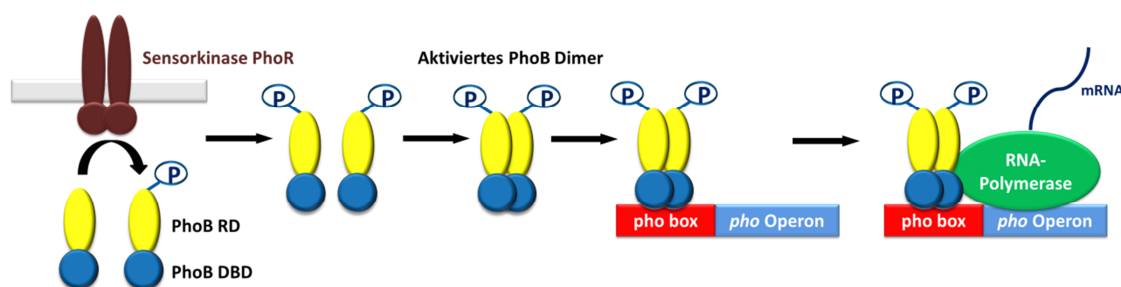


Abbildung 1.2: Zweikomponenten-Regulationssystem PhoR/PhoB

Schematische Darstellung der Transkriptionsaktivierung durch den Transkriptionsfaktor PhoB. Bei geringer Phosphatkonzentration wird der Transkriptionsfaktor PhoB, bestehend aus regulatorischer (RD) und DNA-bindender (DBD) Domäne von der Sensorkinase PhoR durch Phosphorylierung aktiviert. Anschließend dimerisiert PhoB und bindet über seine DBD an *pho box*-Sequenzen, die im Promotorbereich des *pho*-Operons liegen. Dadurch wird eine Bindung der RNA-Polymerase ermöglicht und die Transkription des entsprechenden Gene initiiert.

Physiologisch ist der Transkriptionsfaktor PhoB ein Regulator des Phosphatmetabolismus. Er dient der Adaption an veränderte Umweltbedingungen durch Regulierung der Proteinbiosynthese, wobei mittels Protein-DNA-Interaktion die Expression bestimmter Genprodukte eingeleitet werden. Dabei werden ca. 400 Gene aus allen Bereichen zellulärer

Prozesse durch PhoB über Signaltransduktion reguliert, aber nur ca. 40 Gene direkt durch PhoB als Transkriptionsfaktor exprimiert, darunter auch das PhoB-Protein selbst. [11-13] Die 40 Gene liegen auf neun verschiedenen Regulons und kodieren unter anderem für Phosphat- und ABC-Transporter (Tabelle 1.1). [11,14] Die Expression dieser Gene ermöglicht *E. coli* als Alternative zur Aufnahme anorganischer Phosphate auch die Aufnahme von Phosphonaten und den Katabolismus Phosphat-haltiger Metabolite. [15] Viele der weiteren Genprodukte sind selbst Transkriptionsfaktoren und leiten somit das Signal des Phosphatmangels weiter, wodurch PhoB auch als ein globaler Regulator angesehen werden kann. [13,14,16] Dabei werden nicht nur Proteine des Phosphat-Haushalts sondern auch aus weiteren Bereichen des Zellmetabolismus, der Säureschock-Antwort oder auch der Stressregulation reguliert. [16,17]

Tabelle 1.1: Beispiele für Gene unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors PhoB [11]

Gen	Genprodukt Beschreibung
<i>phoA</i>	Bakterielle alkalische Phosphatase
<i>phoE</i>	Phosphosporin Protein E
<i>phoH</i>	Konserviertes Protein mit Nukleosid Triphosphat-Hydrolase Domäne
<i>phoR</i>	Sensor Histidinkinase
<i>phoU</i>	Chaperone-like PhoR/PhoB Inhibitorprotein
<i>psiE</i>	Phosphatmangel induziertes Protein E
<i>pstSABC</i>	Phosphate Transporter Untereinheiten, P _i Aufnahme
<i>phnCDEFGHIJKLMNOP</i>	ABC-Transporter für Aufnahme und Degradation von Phosphonaten

Für Bakterien ist Phosphat ein essentieller Nährstoff und in vielen zellulären Prozessen, wie der Speicherung von Energie durch ATP, oder der Biosynthese vieler Biomoleküle wie den Nucleinsäuren, involviert. Die Aufnahme von anorganischem Phosphat in die *E. coli* Zelle verläuft primär über den Pst-Transporter. [11,18] Dieser ist ein Multiproteinkomplex, der aus den Proteinen PstS, PstC, PstA, PstB und PhoU besteht. PstS bindet als periplasmatisches Protein anorganisches Phosphat außerhalb der Zelle, welches durch den Transportkanal, bestehend aus den Membranproteinen PstC und PstA, unter ATP-Verbrauch in die Zelle gelangt. ATP wird dabei durch die Permease PstB zur Verfügung gestellt. Zu dem Pst-Multiproteinkomplex gehört auch das PhoU-Protein, welches in der Signalübertragung des Phosphatmangels bei hoher externer Phosphatkonzentration einen Repressionskomplex mit der Sensorkinase PhoR des Zweikomponentensystems PhoR/PhoB bildet. [11]

Sinkt die externe Phosphatkonzentration unter einen Schwellenwert von 4 μM , dissoziiert der Repressionskomplex, PhoR wird autophosphoryliert und überträgt die Phosphatgruppe an Aspartat 53 der regulatorischen Domäne des Transkriptionsfaktors PhoB. [11,19] Dies führt zu einer Konformationsänderung des PhoB-Proteins, welches dadurch aktiviert wird. In dieser aktiven Konformation bilden sich in einer *head-to-tail*-Anordnung PhoB-Dimere aus, in denen die DNA-Bindedomänen in die gleiche Richtung weisen. [20,21] Durch diese Konformationsänderung ist es dem Transkriptionsfaktor möglich, als Dimer an zwei aufeinanderfolgende spezifische DNA-Sequenzen zu binden. Die Konsensus-Sequenz, welche auch als *pho box* bezeichnet wird, liegt im Promotor-Bereich von *pho*-Regulons zehn Nukleotide *upstream* der -10-Region (Pribnow *box*) (Abbildung 1.3). [19] Sie beinhaltet die beiden charakteristischen TGTCA-Motive jeweils gefolgt von T/A-reichen Sequenzen. Ein Vergleich verschiedener *pho*-Regulons wie *phoA*, *phoH* und *pstS* zeigt, dass die beiden TGTCA-Sequenzen stark konserviert sind. [20,22,23] Die A/T-reichen Sequenzen sind im Gegensatz dazu weniger konserviert und weisen eine höhere Divergenz im 3'-terminalen Bereich.

5' CTGTCA TAAANCTGTCA CANTN 3'

Abbildung 1.3: Konsensus-Sequenz des Transkriptionsfaktors PhoB

Zwei PhoB-Proteine binden an die *pho box*-DNA, die aus zwei TGTCA-Motiven (rot) gefolgt von A/T-reichen Regionen besteht. (N beliebige Nukleinsäure)

Die *pho box*-DNA erfährt durch die PhoB-Bindung eine Beugung. [23] Diese Beugung und eine Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor ermöglicht die Anlagerung der σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase, welche die entsprechenden Gene transkribiert. [24] Steigt die Phosphatkonzentration im Periplasma wieder an, wird PhoB von der Sensor kinase PhoR wieder dephosphoryliert und damit inaktiviert.

Strukturell betrachtet umfasst der Transkriptionsfaktor PhoB 229 Aminosäuren, von denen die Aminosäuren 1 – 124 die regulatorische Domäne und die Aminosäuren 125 – 229 die DNA-bindende Domäne bilden. [19] Nicht nur die Struktur der beiden einzelnen Domänen wurde per Röntgenstrukturanalyse und mittels NMR-Untersuchungen bestimmt, sondern auch die Struktur im Komplex mit der DNA. [3,20,21] Dabei ist zu erwähnen, dass eine Bindung des kompletten PhoB-Proteins im unphosphorylierten Zustand durch die RD zwar möglich, aber um Faktor zehn verringert ist. [25,26] Vergleicht man nur die Struktur der DBD im gebundenen und ungebundenen Zustand, ergeben sich hohe Übereinstimmungen der Strukturen, was darauf hindeutet, dass die DBD ohne die RD in der Lage ist die Transkription zu aktivieren. [21] Diese Annahme wurde durch *in vivo* Experimente verifiziert,

in denen verschiedene PhoB-Konstrukte in PhoR/PhoB defizienten *E. coli*-Stämmen eine Expression von *pho* Genen nur durch die DBD von PhoB belegten. [27] Dementsprechend eignet sich die DBD des PhoB-Proteins (PhoB^{DBD}) für Untersuchungen von Protein-DNA-Interaktionen auch ohne die regulatorische Domäne. [25,28]

Generell erfolgt die DNA-Bindung über das *winged-helix-turn-helix*-Motiv der DNA-bindenden Domäne des PhoB-Proteins, welches mit der Erkennungshelix α^3 (rot, AS 192-206) an das TGTCA-Motiv in der großen Furche der DNA bindet. [3,20] Die α^2 -Helix (orange, AS 176-184) stabilisiert dabei den Protein-DNA-Komplex und der C-terminale β -hairpin (gelb, AS 215-226) adressiert die A/T-reiche kleine Furche. Der *loop* zwischen α^2 - und α^3 -Helix (blau, AS 185-191) ist essentiell für die Rekrutierung der RNA-Polymerase über deren σ^{70} -Untereinheit (vgl. Abbildung 1.4). [24,29]

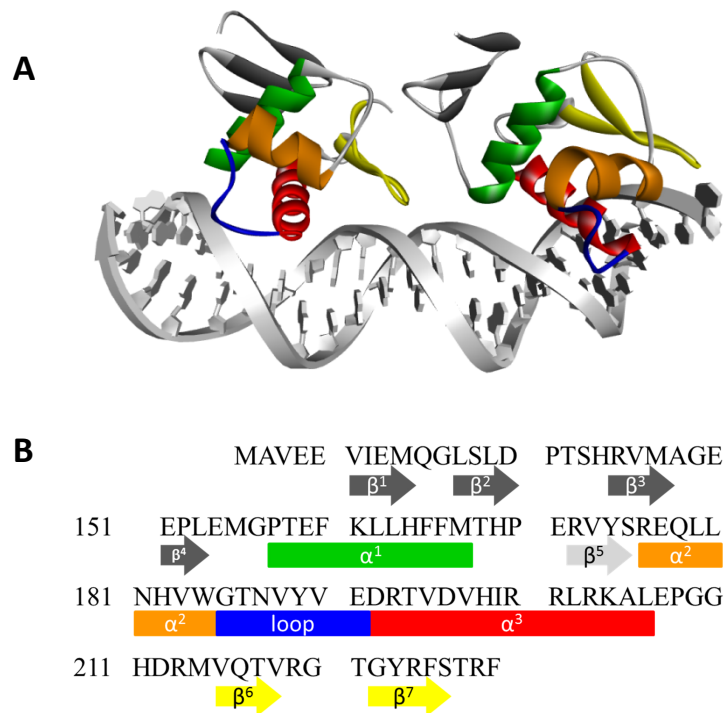


Abbildung 1.4: Kristallstruktur und Aminosäuresequenz der DNA-bindenden Domäne von PhoB

A Kristallstruktur des PhoB-DNA-Komplexes bestehend aus zwei PhoB^{DBD}-Proteinen und einer *pho box*-DNA. Die α^1 -Helix ist grün, α^2 -Helix orange, α^3 -Helix rot und der *loop* blau dargestellt (PDB-Datenbank: 1GXP.pdb). [20] **B** Aminosäuresequenz der DBD von PhoB mit farblich hervorgehobenen Sekundärstrukturmerkmalen.

Durch Untersuchungen des PhoB-DNA-Komplexes mittels Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie konnte die spezifische Erkennung der DNA-Sequenz durch die einzelnen Aminosäuren der PhoB-DNA-Bindedomäne bestimmt werden. [3,20] Dabei zeigte sich, dass die Interaktionen durch hydrophobe Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen stattfinden, welche teilweise auch durch Wassermoleküle vermittelt werden. [3] Abbildung 1.5 gibt einen Überblick über die einzelnen Interaktionen der Aminosäureseitenketten der DBD mit dem TGTC-A-Motiv und der A/T-reichen Sequenz einer *pho box*-DNA.

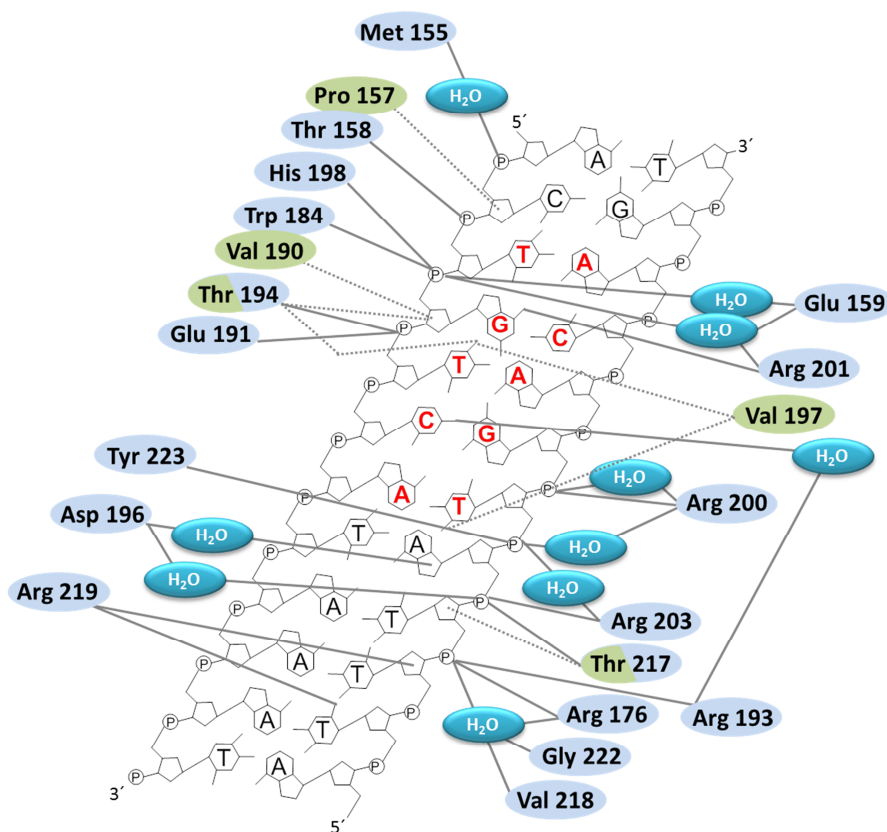


Abbildung 1.5: Schematischer Überblick der Wechselwirkungen zwischen einzelnen PhoB^{DBD}-Aminosäureseitenketten und der Sequenz der *pho box*-DNA

Hellblau markierte Aminosäuren weisen auf Wasserstoffbrückenbindungen und grüne auf hydrophobe Wechselwirkungen hin. Die TGTC-A-Erkennungssequenz in der großen Furche der DNA ist mit roten Nucleinbasen dargestellt. [3]

Untersuchungen zur Pathogenität des *pho*-Regulons konnten zeigen, dass unter anderem die PhoB-abhängige Kontrolle der Stressregulation eine große Bedeutung für die Virulenz von *E. coli* spielt. ^[18] Auch ein Einfluss von PhoB auf die Zusammensetzung der Zelloberfläche durch die Regulation der Expression von Phospholipiden und Exopolysacchariden, wurde untersucht. Durch Mutation einzelner PstS-Proteine konnte die Virulenz von pathogenen Bakterien deutlich reduziert werden. Endotoxine wie das Lipid A und die Fettsäure-Zusammensetzung der Zelloberfläche sind in Pst-*E. coli*-Mutanten verändert und führen zu einem geringeren Widerstand gegen die Immunabwehr von Wirtszellen. Diese Studien zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen der Aktivität des Zweikomponenten-System PhoR/PhoB und der Virulenz dieser Bakterien. ^[18] Die Zweikomponenten-Regulationssysteme bieten daher einen möglichen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Antibiotika, da diese Regulationssysteme in Tieren, wie auch in Menschen, nicht vorkommen. ^[30,31]

1.3. Die Transpeptidase Sortase A

Sortasen sind bakterielle Enzyme, die zur Klasse der Transpeptidasen gehören und die Fähigkeit besitzen, Peptidbindungen zu spalten und neu zu bilden.^[32] Die biologische Funktion der Sortasen besteht in der Verankerung von Oberflächenproteinen an die bakterielle Zellwand. Die Immobilisierung dieser Proteine ist bedeutsam für die Virulenz von Bakterien, da die Oberflächenproteine die Adhäsion an Wirtszellen, die Aufnahme von Nährstoffen und eine Abwehr der Immunantwort ermöglichen.^[33] Die Gene für Sortasen und deren Substrate wurden in fast allen Gram-positiven Bakterien gefunden. Eine Einteilung der Sortasen erfolgte in die Isoformen A, B und C.^[34] Die Sortase A (SrtA) katalysiert als *house keeping* Sortase in allen Gram-positiven Bakterien die kovalente Ligation von Oberflächenproteinen an die bakterielle Zellwand.^[35] Als Substrat erkennt die Sortase A Proteine, die C-terminal ein hochkonserviertes LPXTG-Sortierungs-Signal aufweisen.^[36,37] Je nach Isoform der Sortase können die Erkennungsmotive variieren. So erkennt die Sortase B (SrtB) aus *Staphylococcus aureus* ein NPQTN-Sortierungs-Signal und verankert das Protein IsdC an der Zellwand, welches das Bakterium zur Eisenaufnahme befähigt.^[38] Die Ausbildung von Pili für die Adhäsion an Wirtszellen ist eher bekannt für Gram-negative Bakterien. Jedoch sorgt die Sortase C (SrtC) bei Gram-positiven Bakterien wie *Streptococcus parasenguis* für den Aufbau von Pilus-Strukturen durch die Ligation entsprechender Proteine mit QVPTG-Motiv an Zellwandpeptidoglycane.^[39]

Die beiden Substrate, die Sortase A aus *Staphylococcus aureus* miteinander verknüpft, sind Oberflächenproteine und das verzweigte Lipid II. Die Oberflächenproteine sind sekretierte Proteine, die als Erkennungssequenz ein hochkonserviertes LPXTG-Motiv beinhalten, gefolgt von einer Region, die hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren und einer kurzen terminalen, basischen Region besteht.^[37] Die Sortase A bildet ein Acyl-Enzym-Intermediat mit ihrem Substrat aus und spaltet das LPXTG-Motiv des Proteins zwischen dem Threonin und dem Glycin mit Hilfe seines katalytisch aktiven Cysteinrestes. *In vitro*-Analysen zur Substratspezifität von Sortase A haben gezeigt, dass alle Aminosäuren des LPXTG-Motivs, außer der Aminosäure an der dritten Stelle (X), essentiell sind. An Position X werden fast alle natürlichen Aminosäuren, außer Cys und Trp, die noch nicht untersucht wurden, akzeptiert.^[40] Prototypisch ist das LPETG-Motiv des Protein A, welches ein Substrat der Sortase A aus *Staphylococcus aureus* ist.^[36] Insgesamt wurden 21 Oberflächenproteine mit der LPXTG-Sequenz als SrtA-Substrate in *Staphylococcus aureus* beschrieben.^[41]

Bei der Verknüpfung der Oberflächenproteine wird das Acyl-Enzym-Intermediat nukleophil durch die Aminogruppe der Pentaglycinbrücke des verzweigten Lipid II angegriffen. Das Lipid II ist als Peptidoglycan-Vorläufer an der bakteriellen Zellwand ligiert. [35] Abschließend wird eine neue Peptidbindung zwischen Oberflächenprotein und dem Lipid II ausgebildet und so das Protein an die Zellwand verknüpft. Im Hinblick auf die Glycinkomponente werden als Substrat bei der Transpeptidierungsreaktion *in vitro* nicht nur N-terminal fünf Glycine akzeptiert, sondern auch Verbindungen mit einem einzelnen N-terminalen Glycin. Eine maximale Reaktionseffizienz wird aber mit Substraten mit zwei oder mehr Glycinen erreicht. [42]

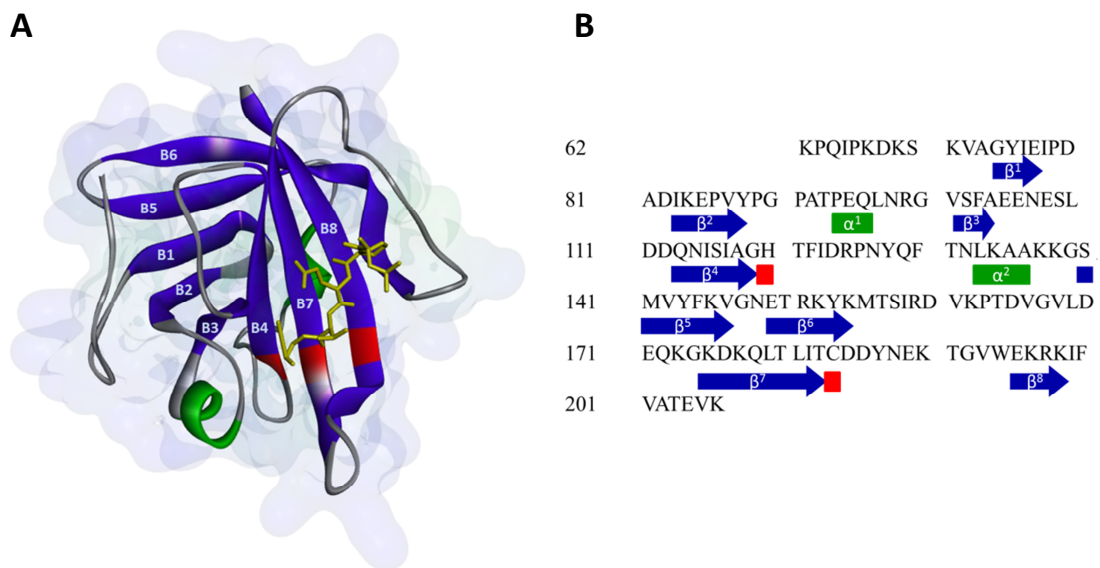


Abbildung 1.6: Kristallstruktur und Aminosäuresequenz der Sortase A aus *Staphylococcus aureus*

A Kristallstruktur der katalytischen Domäne der Sortase A aus *Staphylococcus aureus* im Komplex mit dem LPETG-Substrat. Die dargestellte β -Faßstruktur besteht aus acht β -Faltblättern (blau) die durch unstrukturierte loops miteinander verbunden sind (grau). Des Weiteren zeigt die Struktur zwei α -Helices (grün). Die katalytisch aktiven Aminosäuren His120, Cys184 und Arg197 sind rot hervorgehoben. Das LPETG-Substrat ist in gelb dargestellt (PDB-Datenbank: 1T2W.pdb). [43] **B** Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne der Sortase A aus *Staphylococcus aureus* mit farblich hervorgehobenen Sekundärstrukturmerkmalen.

Die vollständige Transpeptidase Sortase A aus *Staphylococcus aureus* umfasst 206 Aminosäuren, die eine membranassoziierte Domäne (AS 1-59) und eine katalytische Domäne (AS 60-206) ausbilden. Letztere bildet eine ungleichmäßige achtsträngige β -Faltblatt-Struktur aus, auch β -Faßstruktur (β -barrel) genannt (siehe Abbildung 1.6). [43] Die acht β -Faltblätter (blau) sind durch unstrukturierte Schleifen (grau) miteinander verbunden. Die Struktur beinhaltet auch zwei kurze α -Helices (grün). Die Faltblätter β 7 und β 8 bilden eine hydrophobe Spalte, die von den anderen Strängen umgeben ist und in der das

aktive Zentrum liegt. Im aktiven Zentrum befinden sich die katalytischen Reste der Aminosäuren His120, Cys184 und Arg197 (rot), die die Transpeptidierungsreaktion katalysieren. Die β -Faßstruktur und die katalytisch aktiven Aminosäureseitenketten sind in allen Sortase A hochkonserviert und essentiell für deren Aktivität. [44,45]

Ein Vergleich der Strukturen der Sortase-Isoformen SrtA, SrtB und SrtC zeigt, dass die generelle Faltung der β -Faßstruktur und auch die aktiven Seiten der Proteine vergleichbar sind. [43,46,47] Kleinere Abweichungen in der Struktur und andere katalytische Triaden, wie Cys, His und Asp bei SrtB, sind den unterschiedlichen Erkennungsmotiven geschuldet. [35,43,46]

Untersuchungen zur Substratbindung der SrtA $_{\Delta 59}$ aus *Staphylococcus aureus* haben gezeigt, dass die Schleife zwischen $\beta 6/\beta 7$ für die Substratbindung verantwortlich ist. [45,48] Sie interagiert mit dem Substrat oberhalb des Erkennungsmotivs und dirigiert die LPXTG-Sequenz in die korrekte Orientierung zur katalytischen Aminosäure Cys184. [45] Dabei bilden die Aminosäureseitenketten Val168 und Leu169 der Schleife mit den unpolaren Seitenketten von Leu und Pro der Erkennungssequenz hydrophobe Kontakte aus. [48]

Die katalytische Domäne SrtA $_{\Delta 59}$ aus *Staphylococcus aureus* besitzt eine Ca²⁺-Bindestelle, die von der $\beta 3/\beta 4$ Schleife gebildet wird und dem aktiven Zentrum abgewandt ist. [49] Bei Bindung von Calcium wird die Schleife zwischen $\beta 6/\beta 7$ durch Interaktion des Ca²⁺-Ions mit Glu171 koordiniert und dadurch in ihrer Flexibilität einschränkt, was in einer höheren Affinität zum Substrat resultiert. [50] So kann Calcium in physiologischen Konzentrationen als allosterischer Aktivator der Transpeptidierungsreaktion der SrtA $_{\Delta 59}$ aus *Staphylococcus aureus* betrachtet werden. Die Rolle der Calcium-Bindestelle wurde mit Hilfe von Deletionsmutanten untersucht. Dabei zeigte eine Mutante ohne Bindestelle eine verringerte Aktivität. [51] Durch die Bindung von Calcium wird die katalytische Aktivität um das Achtfache erhöht. [49] Generell sind nicht alle Sortasen calciumabhängig. So wird zum Beispiel die SrtA aus *Streptococcus pyogenes* sogar durch Ca²⁺ leicht inhibiert. [52] Andere Sortasen wie SrtB benötigen kein Ca²⁺ für die Aktivität. [53]

Der Mechanismus der Sortase A vermittelten Transpeptidierung wird als reverse Protonierung bezeichnet. [54] Die Seitenketten der Aminosäuren Cys184 und His120 liegen in einem Gleichgewicht zwischen Thiol-Imidazol- und Thiolat-Imidazolium-Form vor, wobei die aktive Form die letztere ist. Katalytisch aktiv ist nur die deprotonierte Form des Cysteinrestes. Bei einem physiologischen pH-Wert ist immer nur ein sehr geringer Anteil von 0,1 % des Enzymes aktiv. [55] Abbildung 1.7 zeigt den detaillierten Mechanismus der Transpeptidierungsreaktion. Im ersten Schritt greift das Thiolat-Nukleophil des Cys184 die LPXTG-Erkennungssequenz (blau) zwischen den Aminosäuren Threonin und Glycin an. Es

entsteht ein Acyl-Enzym-Intermediat, welches durch Arg197 stabilisiert wird (vgl. Abbildung 1.7 a). Dabei interagiert Arg197 höchstwahrscheinlich über eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonylgruppe der zu spaltenden Thr-Gly-Bindung des LPXTG-Motivs und stabilisiert dadurch den Oxyanion-Übergangszustand des Enzyms.^[48] Das Imidazoliumion des His120 protoniert die Aminofunktion der Abgangsgruppe des tetraedrischen Intermediates (a). Nach Eliminierung der Abgangsgruppe greift die Aminofunktion des Glycin-Nucleophils (rot) den Acyl-Enzym-Komplex an (b). Erneut wird ein tetraedrisches Intermediat ausgebildet, bei dem die Ladung erneut von Arg197 stabilisiert und das Proton des nucleophilen Amins von His120 abstrahiert wird (c). Schließlich bildet sich die neue Peptidbindung aus und nach Eliminierung von Cys184 wird das Thiolat reprotoniert (d). Die Transpeptidierungsreaktion durch Sortase A ist generell reversibel, jedoch steht beim natürlichen Mechanismus das LPXTG-Produkt durch den Einbau in die Peptidoglycanschicht nicht mehr als Substrat für eine Rückreaktion zur Verfügung.^[56]

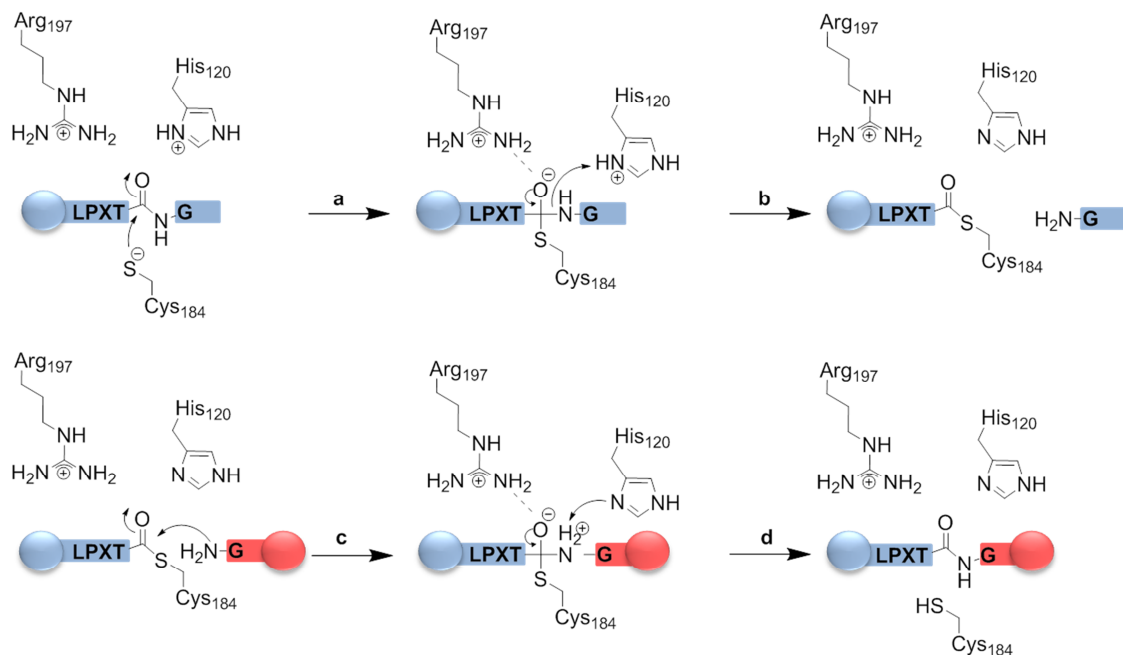


Abbildung 1.7: Mechanismus der Transpeptidierung durch Sortase A

Darstellung der Verknüpfung des LPXTG-Substrates (blau) mit einem Glycin-Nucleophil (rot) durch die Sortase A mittels reverser Protonierung. Die Aminosäuren Cys184, His120 und Arg197 bilden die katalytisch aktiven Seitenketten des Enzyms.^[44,54] (Details siehe Text)

Aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Pathogenität Gram-positiver Bakterien gelten Sortasen als vielversprechendes Angriffsziel für neue Therapeutika. Besonders vor dem Hintergrund, dass einige *Staphylococcus aureus*-Stämme inzwischen resistent gegenüber dem bei multiresistenten *Staphylococci* eingesetzten Vancomycin sind, werden neue Ziele für Antibiotika benötigt.^[57] So konnte bereits in Tiermodellen gezeigt werden, dass bei Infektion mit Sortase-*knock out*-Stämmen die Sortasen essentiell für die Virulenz sind.^[58] Auf der Suche nach Sortase-Inhibitoren für den Einsatz als potentielle Antibiotika wurde ein breites Spektrum an Verbindungen beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass unter anderem Vinylsulfonate inhibitorische Effekte auf die Sortase-Reaktion ausüben indem sie mit der Thiolgruppe des katalytisch aktiven Cysteins ein stabiles Thioether-Addukt bilden.^[59] Als pflanzlicher Inhibitor unterdrückt Curcumin die Fibronectin-Bindungsaktivität der Zelladhäsionsproteine, die durch Sortasen in der Zellwand verankert werden.^[60] Ein *screening* kleiner Moleküle zeigte, dass Aryl- β -amino(ethyl)ketone irreversibel mit der aktiven Seite von Sortasen reagieren.^[61]

1.3.1. Chemoselektive Protein-Modulation

Das Feld der Protein-Modulation bietet viele Methoden zur Veränderung von Proteinen auf chemischer, molekularbiologischer und enzymatischer Basis. Von Interesse ist dabei die Einführung von natürlichen und unnatürlichen Funktionalitäten, wie unnatürliche Aminosäuren, Peptidanaloga, stabile Isotope, Fluorophore und andere biochemische und biophysikalische Sonden. Dazu stehen verschiedene chemoselektive Ligations-Methoden zu Verfügung, darunter die native chemische Ligation (NCL, *native chemical ligation*), die Ligation exprimierter Proteine (EPL, *expressed protein liagation*) und die Sortase-vermittelte Protein-Ligation (SML, *Sortase-mediated protein ligation*).^[62]

Bei der NCL werden Polypeptide aus zwei oder mehr ungeschützten Peptidsegmenten miteinander unter physiologischen Verhältnissen ligiert (Abbildung 1.8).^[63] Dabei greift in einem reversiblen chemoselektiven *capture*-Schritt die Thiolatgruppe eines N-terminalen Cysteins eines Peptids den C-terminalen Thioester eines zweiten Peptids an. In einer intramolekularen Umesterung führt dies zu einem Thioester-Intermediat. Ein nachfolgender intramolekularer S,N-Acylshift (*rearrangement*) resultiert schließlich in einem Ligationsprodukt, bei dem die Peptidedukte durch eine native Amidbindung miteinander verknüpft sind.^[64]

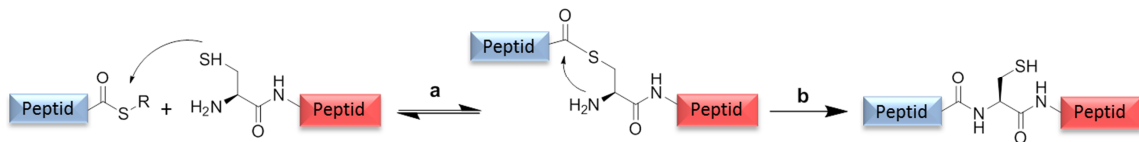


Abbildung 1.8: Mechanismus der nativen chemischen Ligation (NCL)

Der Mechanismus der NCL zur chemoselektiven Ligation von ungeschützten Peptidsegmenten. Im ersten Schritt bildet sich ein Thioester-Intermediat zwischen zwei Peptiden aus (a). Anschließend erfolgt durch einen intramolekularen S,N-Acylshift eine Ligation der beiden Peptide (b). (Details siehe Text)

Ein Nachteil diese Methode ist die häufig schwierige Herstellung des ungeschützten C-terminalen Thioesters des Peptids, bedingt durch die hohe Hydrolyse-Anfälligkeit. Die Herstellung erfolgt durch Festphasen-Peptidsynthese (SPPS, *solid phase peptide synthesis*) mit Hilfe einer Boc-Schutzgruppen-Strategie.^[65]

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung des C-terminalen Thioesters ist die rekombinante Expression eines Intein-Fusionsproteins, aus dem das zu ligierende Protein gewonnen werden kann. [66] Die NCL unter Verwendung eines rekombinanten Proteins zur Herstellung eines semi-synthetischen Zielproteins wird als Ligation exprimierter Proteine (EPL) bezeichnet. [67] Die Methode der EPL beruht auf dem natürlichen Proteinspleißen, ein in der Natur ein weit verbreiteter posttranslationaler Mechanismus. Bei diesem werden aus Vorläuferproteinen ein Teil des Proteins (Intein) durch intramolekulare Umlagerung autokatalytisch entfernt und die flankierenden Proteinbereiche (Exteine) miteinander verknüpft. [68] In Abbildung 1.9 ist der zugrundeliegende Mechanismus dargestellt. Zuerst findet eine N,S-Verschiebung des N-terminalen Cys des Inteins zu einem Thioester zwischen dem Intein und N-Extein statt (a). Danach erfolgt eine Transthioveresterung zwischen einem weiteren Cys statt. Dieses ist die erste Aminosäure des C-Exteins (b). Anschließend führt eine intramolekulare Umlagerung durch einen S,N-Acylshift mit dem Asn am C-terminalen Ende des Inteins zur Bildung eines Succinimides des Inteins und zu einer nativen Peptidbindung zwischen N- und C-Extein (c). [69]

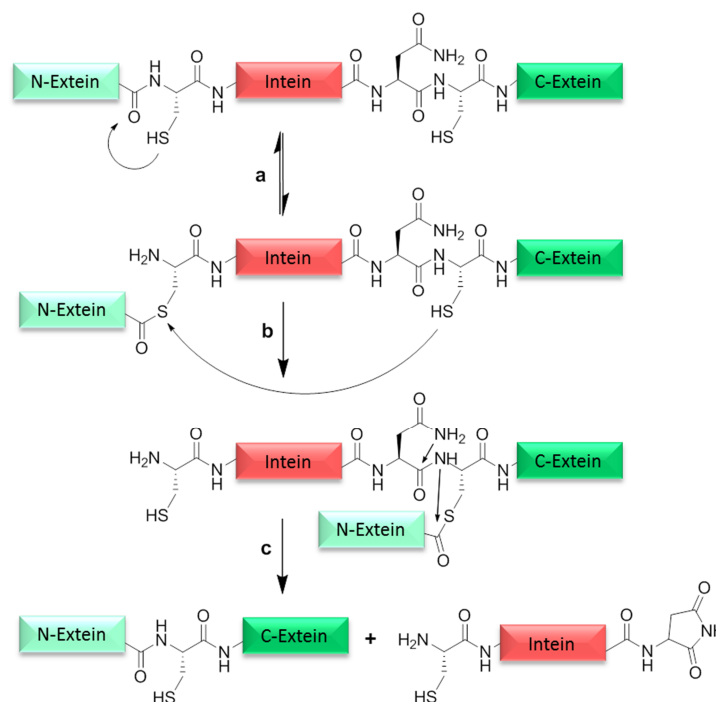


Abbildung 1.9: Natürlicher Mechanismus des Proteinspleißens

Bei dem natürlichen Mechanismus des Proteinspleißens werden die beiden Exteine des Vorläuferproteins durch N,S-Verschiebung (a), Transthioveresterung (b) und anschließendem S,N-Acylshift (c) miteinander verknüpft. (Details siehe Text)

Bei der EPL wird durch die Fusion des zu ligierenden Proteins mit einem Intein Mechanismus des posttranslationalen Proteinspleißens des Inteins genutzt, um den C-terminalen Thioester herzustellen. [66] Das zu ligierende Protein wird molekularbiologisch mit einem Intein und häufig auch mit einem Aufreinigungs-*tag*, wie einer Chitin-Bindedomäne (CBD), fusioniert (Abbildung 1.10). [70] Die eingesetzten Inteine sind mit molekularbiologischen Methoden derart verändert, dass die natürliche Spleißreaktion durch die intramolekulare Umlagerung nicht komplett verläuft, sondern auf der Stufe der Transthioveresterung stoppt (a). Durch Zugabe von Thiolderivaten wie 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (MESNA) entsteht über einen Thiol-Thioester-Austausch der gewünschte Proteinthioester (b). Dieser kann dann zur Ligation analog zur NCL eingesetzt werden. Auch hier entsteht ein Thioester-Intermediat (c), welches anschließend durch intramolekulare Umlagerung zur Ligation der beiden Fragmente führt (d). [66] Zwar ist bei der Methode der EPL der Größe der Proteine im eigentlichen Sinne kaum Grenzen gesetzt, jedoch ist die Herstellung rekombinanter Proteine teilweise langwierig und es können Probleme bei der Expression des Fusionsproteins unter anderem in Form von *inclusion bodies* auftreten. [71]

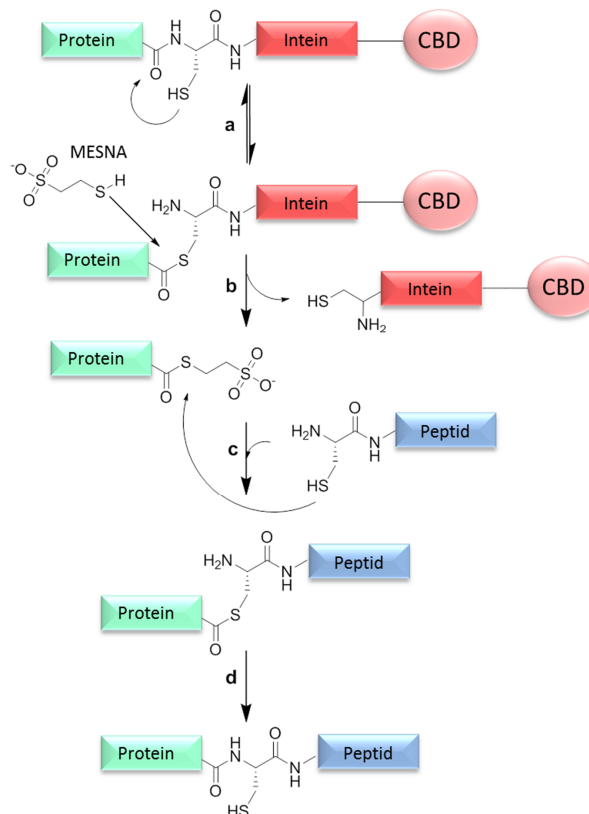


Abbildung 1.10: Mechanismus der Ligation exprimierter Proteine (EPL)

Bei der EPL wurde der natürliche Mechanismus des Proteinspleißens modifiziert und wird zur Darstellung des Proteinthioester verwendet. Dieser wird anschließend zur Modifizierung des Proteins in einer NCL eingesetzt. (Details siehe Text)

Für die chemo- und regioselektive Verknüpfung von synthetischen Peptiden oder rekombinanten Proteinen findet die enzymatische Transpeptidierung durch Sortase A als eine weitere Methode der Protein-Modulation immer mehr an Bedeutung.^[72] So findet sie bereits breite Anwendung bei der Modifikation und Biokonjugation von Proteinen und Peptiden. Unter anderem wurden mit der SML Proteine mit Fluorophoren oder unnatürlich Funktionalitäten versehen.^[73,74] Auch eine Immobilisierung auf festen Oberflächen, posttranslationale Modifizierungen oder Oligomerisierungen waren erfolgreich.^[75-79] Sogar Zelloberflächen von lebenden Säugerzellen wurden bereits per Sortase mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert.^[80]

Für die SML kann eine trunkierte Form der Sortase A (SrtA_{Δ59}), bei der die N-terminale Membran-assoziierte Domäne deletiert wurde, in hohen Ausbeuten und voll funktionsfähig rekombinant in *E. coli* hergestellt werden.^[49] Die für die SML benötigten Anforderungen an die Substrate bestehen aus einem LPXTG-Motiv und einem N-terminalem Glycinrest als Nukleophil. Diese Sequenzen können leicht in Peptide und Proteine mittels SPPS oder molekularbiologisch eingefügt werden. Aufgrund der geringen Toleranz der Sortase gegenüber Variationen des Erkennungsmotives ist die SML hoch spezifisch und regioselektiv.^[36,37] Des Weiteren ist das Vorkommen des Motives in Säugerproteinen selten.^[78] Durch die milden Reaktionsbedingungen im wässrigen Milieu, bei physiologischem pH-Wert und keiner Notwendigkeit der Zugabe von Thiolen oder anderen Reduktionsmitteln eignet sich Sortase A insbesondere auch für labile Substrate, wie z. B. über Disulfidbrücken gefaltete oder glycosylierte Proteine.^[72,77,81] Ein Problem stellt oft die schlechte Löslichkeit von Substraten in wässrigen Puffern da. In diesem Fall können jedoch auch organische Lösungsmittel als Cosolventien verwendet werden, da Sortase auch unter Bedingungen mit 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Polyethylenglycol (PEG) aktiv ist.^[78] Ein weiterer Vorteil der Sortase ist, dass sie nicht nur in hohen Ausbeuten exprimiert werden kann, sie stellte sich auch als ein sehr robustes Enzym heraus. Eine Lagerung über mehrere Monate führt weder zu Degradation noch zu Aktivitätsverlust.^[82] Auch lyophilisierte Sortase ist nach Resuspension aktiv.^[83] Aufgrund dieser einfachen Voraussetzungen wurde die SML bereits bei einer Vielzahl von Protein-Modulationen und Biokonjugationen eingesetzt. Ein Nachteil bei der Modifizierung mittels Sortase A ist die Reversibilität der Transpeptidierungsreaktion, da nach der Reaktion das LPXTG-Motiv im Produkt verbleibt und somit erneut als Substrat fungieren kann.^[56] Durch den Einsatz einer Depsipeptid-Bindung zwischen dem Thr und Gly des LPXTG-Substrates kann die Rückreaktion verhindert werden, da das eliminierte Glycolsäurederivat nicht als Glycin-analoges Nukleophil agieren kann.^[84] Ein weiterer Nachteil ist eine mögliche Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates, die hauptsächlich in Abwesenheit des Glycin-Nukleophils

auftritt. Auch lange Inkubationszeiten bei geringen Proteinkonzentrationen führen zur Hydrolyse. [42] Der Einsatz eines Überschusses an Glycin-Nukleophil kann das Reaktionsgleichgewicht in Richtung Produkt verschieben und führt zu höheren Umsätzen. So kann die Reversibilität der Reaktion und das Risiko der Hydrolyse minimiert werden. [84]

Die enzymatische Transpeptidierung durch Sortase A kann zur Modifikation des C- oder N-Terminus von Peptiden und Proteinen eingesetzt werden (Abbildung 1.11). Der Reaktionsmechanismus erfolgt analog der natürlichen Verknüpfung von Oberflächenproteinen an die bakterielle Zellwand. [49]

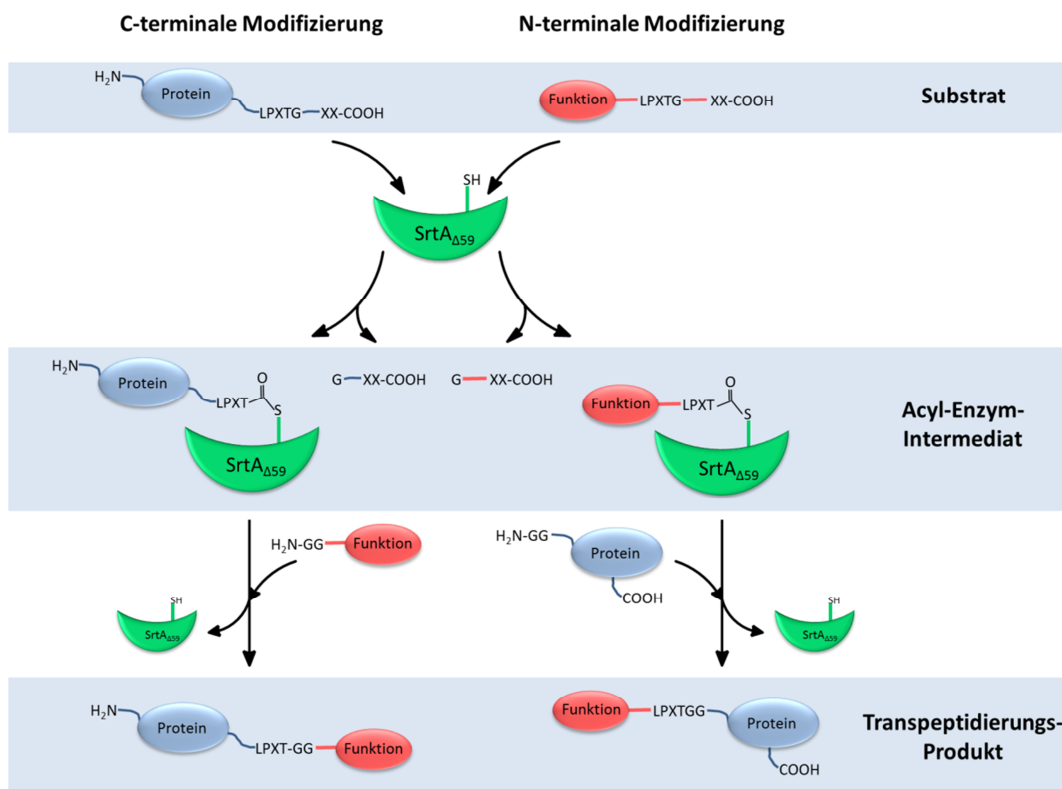


Abbildung 1.11: C- und N-terminale Modifizierung von Proteinen oder Peptiden durch Sortase A-vermittelte Transpeptidierung

Die C-terminale (links) und N-terminale (rechts) Einführung von Funktionalitäten erfolgt über ein Acyl-Enzym-Intermediat nach Substraterkennung (LPXTG-Motiv). Nach Angriff eines Glycin-Nukleophils entsteht über eine native Peptidbindung das Transpeptidierungsprodukt. [32] (Details siehe Text)

Die Methode der SML wurde als erstes *in vitro* zur Ligation des grün fluoreszierenden Proteins GFP (green fluorescent protein), welches ein C-terminales LPETG-Motiv beinhaltet, mit Peptiden und Proteinen, die N-terminale Glycinreste aufwiesen, erfolgreich eingesetzt. [73] Funktionalitäten wie Azide, als auch Fluorophore wie Fluorescein wurden mittels endogener Sortase A kovalent an die Membran von *Staphylococcus aureus* gebunden. [74]

Eine weitere interessante Anwendung ist die Immobilisierung von Proteinen auf feste Oberflächen. So wurden unter anderem GFP-Proteine mit C-terminalem LPXTG-Motiv auf Oligoglycin funktionalisierte Polymer-Beads und Glasoberflächen immobilisiert.^[75] Auch der Einsatz zur Immobilisierung von Proteinen mit C-terminalem LPXTG-Motiv mittels Sortase auf einem mit Triglycin funktionalisiertem Biochip zur Messung von Oberflächenplasmonresonanz war erfolgreich. Die SML bietet hier einen sanften und robusten Ansatz für eine ortsgerichtete Kupplung von Proteinen auf die Chipoberfläche. Der Vorteil der Sortase mediierten Ligation ist die gleiche Orientierung der immobilisierten Proteine im Gegensatz zu anderen Verfahren, bei denen die Orientierung teilweise willkürlich ist. Für eine Analyse von Liganden müssen Proteine spezifisch und ortsgerichtet immobilisiert werden, damit die Bindestelle zugänglich ist.^[76] Der Gebrauch von Sortase als „*molecular stapler*“ zur Herstellung von Protein-Dimeren und -Oligomeren erfolgte mittels bifunktionellen Substraten, die N-terminal einen Triglycinrest und C-terminal das LPETG-Motiv aufwiesen.^[79] Die Präparation von Oligopeptid-Nukleinsäure-Hybriden gelang ebenfalls mittels Sortase-vermittelter Modifikation. Eine Peptid-Nukleinsäure wurde C-terminal mit dem LPXTG-Motiv versehen und mit einem N-ständigem Glycinrest modifizierten, zellpenetrierenden Protein ligiert. Das Konjugat wurde mittels seiner antisense-Aktivität in einem *splicing-assay* in HeLa Zellen auf seine biologische Aktivität positiv getestet.^[78,85] Nicht nur N-terminale Glycinreste eignen sich als Nukleophil der Transpeptidierungsreaktion. Auch die Aminofunktionen von Aminoglycosiden in Glycoproteinen werden von der Sortase akzeptiert.^[77,86] So konnten Aminosid-Antibiotika, unter anderem der Kanamycin-Klasse, per SML mit LPXTG-Peptiden zu Neoglyco-Konjugation modifiziert werden.^[77] Sogar lebende Säugerzellen wurden auf ihrer Zelloberfläche mit Fluorophoren markiert. Dazu wurden sie mit Plasmiden, die Membranproteine mit LPXTG-Motiv exprimieren, transfiziert und anschließend mit Sortase und Gly3-GFP oder Gly3-Alexa im Medium inkubiert. Per Fluoreszenz-Mikroskopie konnte bereits nach fünf Minuten Inkubation der Zellen mit einem Sortase-Fluorophor-Reaktionsansatz markierte Zellen beobachtet werden. Eine Langzeitinkubation zeigte keine toxischen Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen durch die Sortase-Behandlung.^[80]

Wie an den oben genannten Beispielen zu erkennen ist, akzeptiert die Sortase für Transpeptidierungen ein breites Substratspektrum, solange das LPXTG-Motiv exponiert ist. Bezüglich der Nukleophil-Komponente werden auch andere Substrate als N-terminale Glycinreste akzeptiert. Durch die physiologischen und milden Bedingungen der Transpeptidierungsreaktion bleibt die biologische Aktivität der Zielproteine erhalten. Zusammenfassend ist die Verwendung der Sortase eine chemoselektive, robuste und

zuverlässige Methode für die Proteinmodifikation und kann für eine breite Palette an Modifizierungen von Polypeptiden eingesetzt werden.

1.3.2. Cyclische Proteine

Bei cyclischen Proteinen sind die N- und C-Termini der Peptidkette über eine Peptidbindung miteinander ligiert. Diese *head-to-tail*-Ligation erzeugt ein kontinuierliches Peptidrückgrat, durch das cyclische Proteine im Vergleich zu herkömmlichen linearen Proteinen eine außergewöhnliche strukturelle und proteolytische Stabilität aufweisen.^[87] In der Natur gibt es viele Beispiele cyclischer Proteine, die häufig eine antibakterielle oder antifungale Funktion haben. Ein genereller Vorteil der cyclischen Proteine ist ihre geringe Sensitivität gegenüber Proteolyse. Bei linearen Proteinen ist die Schwachstelle der flexible Terminus, der ein Ziel für eine Degradation durch Proteasen ist. Darüber hinaus zeigten sich cyclisierte Proteine als biologisch aktiver. Erst in den letzten Jahren häuften sich die Entdeckungen cyclischer Proteine in Bakterien, Pflanzen und Säugern.^[88] Eines der größten bekannten cyclischen Proteine ist das hoch basische, 70 Aminosäuren umfassende Protein Bacteriocin AS48 aus *Enterococcus faecalis*. Die Funktion dieses Toxins besteht in der Abwehr von Bakterien, in dem es Poren in der Zellwand fremder Bakterien bildet. Durch seine *head-to-tail* Konformation, zeigt es eine hohe Stabilität durch eine Denaturierungstemperatur von 93 °C.^[89] Viele Toxine aus Pilzen sind kleine cyclische Peptide von bis zu 12 Aminosäuren, die nicht-ribosomal in Cytoplasma synthetisiert werden und oft ungewöhnliche Aminosäuren beinhalten. Ein Beispiel für kleine cyclische Peptide ist das Cyclosporin A, das die Transplantations-Medizin durch seine immunsuppressive Wirkung revolutionierte. Das Peptid kommt ursprünglich in bestimmten Schlauchpilzen vor und besteht aus nur 11 Aminosäuren. Es inhibiert die Ausschüttung von immunstimulierenden Stoffen und dadurch die Vermehrung von Leukozyten.^[90] Die größte Gruppe von cyclischen Proteinen bilden mit über zehntausend die pflanzlichen Cyclotide, die häufig antibakteriell oder antifungal sind oder eine Rolle im Schutz der Pflanze gegen Insekten spielen.^[91] Die ca. 30 Aminosäuren großen Proteine zeichnen sich durch ihre cyclische Form und hochkonservierte Cysteinreste aus, die durch Disulfid-Brücken die ringförmige Struktur stabilisieren. Dadurch sind Cyclotide extrem stabil und zeigen sich resistent gegenüber enzymatischer Hydrolyse und thermischer Denaturation. Die biologische Aktivität bleibt auch nach dem Kochen mit Wasser und alkoholischen Lösungen für lange Zeit beibehalten.^[92] Durch ihre vielfältigen biologischen Aktivitäten, ihrer Stabilität und Proteolyseresistenz beinhalten Cyclotide potentiell wichtige Leitstrukturen für

Arzneimittel.^[93] Auch in Säugern wurde ein kleines, 18 Aminosäuren großes, cyclisches Protein gefunden. Das Rhesus theta defensin-1 aus Rhesus-Makaken besitzt eine antimikrobielle Wirkung, die in cyclisierter Form dreimal höher ist als beim linearen Analogon.^[94] Neuere Studien zeigten, dass dieses Protein auch Infektionen durch HIV inhibieren kann.^[95] Über die allgemeine Biosynthese der cyclischen Proteine ist wenig bekannt. Da viele Gensequenzen von Vorläuferproteinen identifiziert sind, müssen sie durch Spaltungs- und Cyclisierungsschritte aus längeren Vorläuferproteinen prozessiert werden.^[96]

Viele der in der Natur zahlreich vorkommenden cyclischen Moleküle offenbarten sich als Wirkstoffkandidaten, von denen viele durch *screening* auf ihre potentielle therapeutische Wirksamkeit untersucht wurden. Cyclische Proteine sind aufgrund ihrer hohen Stabilität und geringen Proteolyse-Anfälligkeit als potentielle Wirkstoffe in der Entwicklung von Arzneimitteln geeignet.

Die Entwicklung neuer Ligations-Methoden ermöglicht eine einfachere Herstellung cyclischer, *head-to-tail* ligierter Proteine. Dabei eignen sich besonders solche Proteine, deren Termini sich in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Zwei der bisher am häufigsten genutzten Methoden zur Cyclisierung von Proteinen sind die unter Protein-Modulation beschriebene native chemische Ligation (NCL) und die darauf basierende Ligation exprimierter Proteine (EPL). Die NCL erfordert dazu die Konstruktion einer linearen Vorläufersequenz per SPPS, die N-terminal ein Cystein und C-terminal einen Thioester-Rest aufweist, die zu einem cyclischen Protein reagieren können.^[63] Bei der EPL wird ein Fusionsprotein konstruiert, bei dem das zu cyclisierende Zielprotein von zwei Inteinen flankiert wird.^[66] Auch hier kann der natürlich vorkommende Mechanismus des posttranslationalen Proteinspleißens des Inteins genutzt werden, um ein cyclisches Protein herzustellen. Die Methode der Protein-Modulation durch Sortase findet auch bei der Herstellung von kovalent geschlossenen, cyclischen Proteinen Anwendung. Zuerst entstand bei dem Versuch der Oligomerisierung von bifunktionellen Substraten mit C-terminalem LPETG-Motiv und die N-terminalem Triglycinrest ein cyclisches Nebenprodukt.^[79] Diese Tatsache wurde aufgegriffen und der Einsatz von Sortase zur Synthese cyclischer, *head-to-tail* ligierter Proteine untersucht. Der Mechanismus zur Cyclisierung durch Sortase ist eine intramolekulare Transpeptidierung, die wiederum analog der natürlichen Verknüpfung von Oberflächenproteinen an die bakterielle Zellwand ist (Abbildung 1.12).^[49] Voraussetzungen hier sind jedoch, dass das zu cyclisierende Protein bifunktionell mit dem Sortase Motiv-LPXTG und einem N-ständigen Glycinrest ausgestattet ist und sich die Enden des Proteins in geeigneter Nähe zueinander befinden.

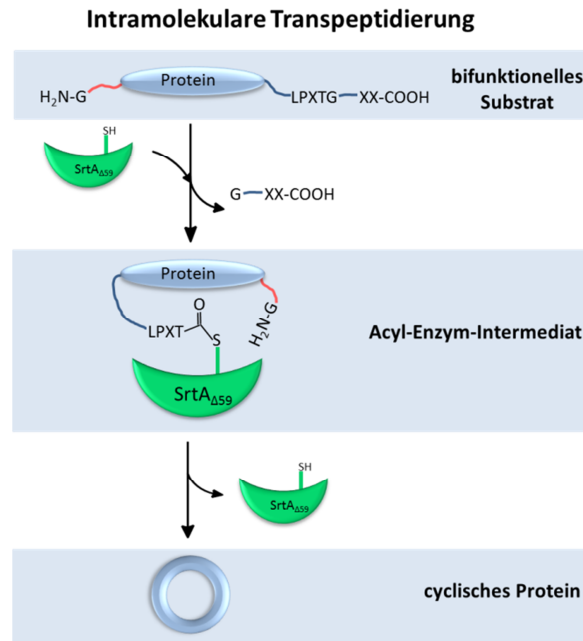


Abbildung 1.12: Cyclisierung von Proteinen durch intramolekulare Transpeptidierung mittels SML

Ein Protein mit C-terminalem LPXTG-Motiv und N-terminalem Glycinrest eignet sich als Substrat für die Cyclisierung durch die Sortase-vermittelte intramolekulare Transpeptidierung. Das LPXTG-Motiv wird in einem Acyl-Enzym-Intermediat zwischen Thr und Gly gespalten. Anschließend greift das N-terminale Glycin-Nukleophil an und eine neue Peptid-Bindung führt zu einer kovalenten, *head-to-tail* Verknüpfung des Proteins.

Die gezielte Sortase A-vermittelte Cyclisierung wurde von Ploegh et al. etabliert. Unter anderem wurde ein bifunktionell modifiziertes GFP-Protein eingesetzt und mit hoher Effizienz cyclisiert. Das cyclisch modulierte GFP zeigte eine höhere Stabilität bezüglich thermischer Denaturierung und erlangte seine Fluoreszenz nach Erhitzen schneller wieder als die lineare Form.^[97] Auch weitere Proteine wurden mittels SML bereits erfolgreich cyclisiert. Ein Beispiel ist die Cyclisierung der bakteriellen Protease Histatin durch Veerman et al.. Die chemische Synthese des cyclischen Histatin verläuft nur in unzureichenden Ausbeuten im Gegensatz zur Modifizierung durch Sortase. Die biologische Aktivität des cyclisierten Proteins erwies sich um das 1000 fache höher als die der linearen Form.^[98] Dies unterstützt die Hypothese, dass eine Cyclisierung drastisch die biologische Aktivität und auch die Rezeptor-Affinität erhöht.

Bei der Cyclisierungsreaktion mittels Sortase sind die Substratanforderungen einfach mit Hilfe von SPPS oder molekularbiologisch zu erreichen. Durch die Sortase-vermittelte Cyclisierung verbleiben nur fünf zusätzliche Aminosäuren (LPXTG) an der Stelle der N- und C-terminalen Ligation, die keinen großen Einfluss auf die biologische Funktion des Proteins ausüben sollten. Weiterhin hat die Transpeptidierungsreaktion unter physiologischen

Bedingungen keinen negativen Einfluss auf die biologische Aktivität des cyclischen Produktes. Somit bietet die Sortase-katalysierte intramolekulare Transpeptidierung eine attraktive Alternative zu bestehenden Methoden zur Herstellung cyclischer Peptide und Proteine, die vor allem in der biomedizinischen Forschung aufgrund ihrer erhöhten biologischen Aktivität, Stabilität und Rezeptor-Affinität Anwendung finden.

2. Zielsetzung

Protein-DNA-Interaktionen sind essentiell für die wichtigsten regulatorischen Prozesse der Zelle, wie die Genexpression oder DNA-Replikation. Dabei basiert diese Interaktion auf einer Kombination aus verschiedenen Bindungsmechanismen, wie direkte spezifische Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen oder unspezifische Erkennung der lokalen DNA-Konformation. Aufgrund der Komplexität der Interaktionsmechanismen ist es von großer Bedeutung, die einzelnen Interaktionen gezielt an Modell-Systemen zu untersuchen, um ein besseres Verständnis dieser Mechanismen zu erlangen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Transkriptionsfaktor PhoB aus *E. coli* aufgrund seiner DNA-bindenden Eigenschaft zur Analyse der zugrundeliegenden Protein-DNA-Interaktionen eingesetzt.

Um auf molekularer Ebene die Beiträge einzelner Aminosäuren der DNA-bindenden Domäne des PhoB-Proteins an der DNA-Bindung zu untersuchen, sollten Alanin-Punktmutanten molekularbiologisch dargestellt und für Protein-DNA-Interaktionsanalysen verwendet werden. Hierfür sollten Aminosäuren zu Alanin substituiert werden, die laut Kristallstruktur an der Bindung der großen Furche der *pho box*-DNA beteiligt sind. Die *pho box* beschreibt die Konsensus-Sequenz verschiedener *pho*-Regulons und umfasst zwei hochkonservierte TGTC-A-Motive, jeweils gefolgt von weniger strikten A/T-reichen Sequenzen. Für die Untersuchung der DNA-Bindfähigkeit der hergestellten PhoB^{DBD}-Mutanten sollten kurze DNA-Oligonukleotide verwendet werden, die eben diese Konsensus-Sequenz beinhalten und auf der *pho box* des *pstS*-Regulons basieren. Um Rückschlüsse auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen zwei PhoB^{DBD}-Proteinen bei Bindung an DNA ziehen zu können, sollten DNA-Oligonukleotide mit einer oder zwei vollständigen PhoB-Bindestellen eingesetzt werden.

Mittels CD-Spektroskopie und Oberflächenplasmonresonanz (SPR) sollten die PhoB^{DBD}-Mutanten auf ihre DNA-Bindfähigkeit hin untersucht werden. Um auszuschließen, dass ein eventuell verändertes Bindungsverhalten der Mutanten im Vergleich mit dem PhoB^{DBD}-Wildtyp durch eine Konformationsänderung der rekombinanten Proteine resultiert, sollten zunächst CD-Sekundärstrukturanalysen zur Überprüfung der korrekten Faltung durchgeführt werden. Anschließend sollte die DNA-Bindung durch Bestimmung der Protein-DNA-Komplexbildung mit Hilfe der CD-Spektroskopie überprüft werden.

Als weitere Methode sollte mittels SPR die Spezifität der DNA-Bindung verifiziert werden. Die Quantifizierung der Affinitäten der DNA-Bindung der verschiedenen PhoB^{DBD}-Mutanten sollte durch Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten erfolgen. Dadurch sollte sich ein differenziertes Bild der Interaktionen einzelner PhoB^{DBD}-Aminosäuren mit der *pho box*-DNA im Vergleich zum Wildtyp-Protein ergeben.

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war die Darstellung eines cyclischen PhoB^{DBD}-Proteins durch Sortase-vermittelte Protein-Ligation. Hierfür sollte die Sortase A aus *Staphylococcus aureus* zur intramolekularen Transpeptidierung von PhoB^{DBD} zu einem kovalent geschlossenen, cyclischen Protein eingesetzt werden. Die Sortase A sollte zunächst rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden. Um die Aktivität der Sortase zu überprüfen, die Transpeptidierungsreaktion zu etablieren und zu optimieren, sollte ein HPLC-basierter Assay unter Verwendung von zwei kurzen Peptiden als Substrate verwendet werden. Die hierfür benötigten Peptide, ein Peptid mit C-terminalem LPXTG-Motiv und ein Peptid mit N-terminalem Diglycinrest, sollten per automatisierter, mikrowellenunterstützter Festphasenpeptidsynthese (SPPS) synthetisiert werden. Die Peptide sollten anschließend für ihre Sortase-vermittelten Ligation eingesetzt werden.

Um das PhoB^{DBD}-Protein in einer Sortase-vermittelten Transpeptidierung zu cyclisieren, sollte die DNA-bindende Domäne molekularbiologisch zu einem bifunktionellen Sortase-Substrat mutiert werden. Dafür sollte die Aminosäuresequenz C-terminal ein exponiertes LPXTG-Motiv aufweisen und N-terminal einen Glycinrest aufweisen. Die Cyclisierung des bifunktionellen PhoB^{DBD}-Substrats sollte per SDS-PAGE und massenspektrometrisch analysiert und nach erfolgter intramolekularer Transpeptidierung aufgereinigt werden.

Für eine mögliche Separation der Sortase A aus dem Reaktionsgemisch sollte eine immobilisierbare Variante des Enzyms molekularbiologisch durch Fusion mit einer Chitin-Bindedomäne hergestellt werden. Diese sollte wiederum auf ihre Funktionalität hin mit dem HPLC-basierten Assay überprüft werden und anschließend zur Cyclisierung von PhoB^{DBD} eingesetzt werden.

Das cyclisierte PhoB^{DBD}-Protein sollte auf eine mögliche erhöhte thermische Stabilität durch temperaturabhängige CD-Messungen analysiert werden, die eine Aussage über die Denaturierungstemperatur und Faltung des Proteins erlauben. Abschließend sollte das cyclisierte PhoB auf seine DNA-Bindefähigkeit mittels CD-Spektroskopie und SPR charakterisiert werden.

3. Materialien

3.1. Geräte

Gerät:

Äkta-Ettan Flüssigkeits-Chromatographie-System

Äkta-Ettan Säule Superdex 75 3.2/30PC

Analysewaage

Autoklav 2540 EL V

Biacore 3000

Brutschrank B6 Function Line

Chromatographiesäule Column C10/10

Gelapparatur

Laborwaage

LAS-3000 Imaging System (Geldokumentation)

Liberty Automated Microwave Peptide Synthesizer

Mikrotiterplatten Reader Spektraflour plus

Millipore Milli Q Reinstwasseranlage

Mini-Protean 3 Elektrophorese System

NanoDrop 1000 Photospektrometer

pH-Elektrode Inlab 420

pH-Meter MP 220

Quarzküvette 110-QS

Rotationsverdampfer Laborota 4000

Schüttelinkubator Certomat IS

Spritzenpumpe KDS100

Thermocycler

Thermomixer compact

UV-Vis-Spektrometer Helios Y

Hersteller:

GE Healthcare (München)

GE Healthcare (München)

Kern (Bulinger-Frommern)

Systec GmbH (Wettenberge)

GE Healthcare (München)

Heraeus (Hanau)

GE Healthcare (München)

Bio-Rad Laboratories (München)

Sartorius (Göttingen)

Fujifilm (Tokio, Japan)

CEM (Kamp-Lintfort)

Tecan (Crailsheim)

Millipore (Eschborn)

Bio-Rad Laboratories (München)

PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)

Mettler TOLEDO (Gießen)

Mettler TOLEDO (Gießen)

Hellma Analytics (Mühlheim)

Heidolph Instruments (Schwabach)

Satorius Stedim

(Aubagne, Frankreich)

KD Scientific (Holliston, USA)

PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)

Eppendorf (Hamburg)

Sectronic Unicam (Leeds, UK)

Analytische HPLC:

Accela Flüssigchromatographie System	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Accela Pumpe 600	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Accela PDA Detector	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Accela Autosampler	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Säule Hypersil GOLD 3 μm C18 175 \AA	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Säule Jupiter 5 μm C18 300 \AA	Phenomenex (Aschaffenburg)

CD-Messungen:

CD-Spectrometer J-810	Jasco (Gross-Umstadt)
Umwälzkühler HAAKE WKL26	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kontrolleinheit Jasco CDF-426 S	Jasco (Gross-Umstadt)

Massenspektrometer:

MALDI-ToF Voyager-DE BioSpectrometry Workstation	PE Biosystems (Weiterstadt)
Esquire 3000 iontrap MS	Bruker Daltronik (Bremen)
HPLC Kopplung: ZQ 2000 mit Alliance HAT (MS: Esquire 3000)	Waters (Milford, USA)
Ultrafelxtreme MALDI-ToF/ToF MS	Bruker Daltronik (Bremen)

Präparative HPLC:

LaChrom Flüssigkeitschromatographie System	
LaChrom Pumpe L-7150	Hitachi Merk (Darmstadt)
LaChrom Detektor (Detektion bei $\lambda = 220 \text{ nm}$),	Hitachi Merk (Darmstadt)
LaChrom Controller Interface D-7000	Hitachi Merk (Darmstadt)
Vorsäule Hypersil GOLD 8 μm	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Säule Jupiter Proteo 10 μm C18 90 \AA C12	Phenomenex (Aschaffenburg)

Zentrifugen:

Zentrifuge 5810 R Ausschwingrotor A-04-62	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5810 R Festwinkelrotor F-34-06-38	Eppendorf (Hamburg)
Minispin	Eppendorf (Hamburg)

3.2. Verbrauchsmaterialien

Material:

Biacore Sensorchip SA
 Dialysemembran SnakeSkin, 3500 WWCO
 Einmalküvetten
 Einmalspritzen
 Membranfilter (Cellulosemischester, 0,2 µm)
 Mikrotiterplatten Polystyrol Micro Well
 PCR Reaktionsgefäße
 PE-Röhrchen
 Petrischalen 6 cm
 Pipettenspitzen
 Reaktionsgefäße 1,5 ml
 Spritzenfilter 0,2 µm
 VIVASPIN 20 Zentrifugalkonzentratoren
 ZipTip C18 Pipettenfilter

Hersteller:

GE Healthcare (München)
 Pierce (Rockford, USA)
 Brand (Wertheim)
 Brand (Wertheim)
 Whatman (Dassel)
 Sarstedt (Nümbrecht)
 PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
 Sarstedt (Nümbrecht)
 Sarstedt (Nümbrecht)
 Sarstedt (Nümbrecht)
 Sarstedt (Nümbrecht)
 Sarstedt (Nümbrecht)
 Satorius Stedim Biotech (Göttingen)
 Merk Millipore (Billerica, USA)

3.3. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden mindestens analyserein (p. A.) bei den folgenden Herstellern bezogen: Alpha Aesa (Emmerich), AppliChem (Darmstadt); Bachem (Weil am Rhein), Carl Roth (Karlsruhe), Clontech (Heidelberg), Fluka (Steinheim), NEB (Frankfurt a.M.), Iris Biotech (Marktredwitz), Merk (Darmstadt), Molecular Genetics (Wessex, UK), Sigma-Aldrich (München), VWR International (Leuven, Belgien).

3.4. Enzyme

Tabelle 3.1: Enzyme

Bezeichnung	Eigenschaften	Bezugsquelle
DpnI	Restriktionsenzym (methylierte <i>template</i> DNA) 5`...GA↓TC...3` 3` C T↑AG...5`	New England Biolabs
NdeI	Restriktionsenzym 5`...CA↓TA TG...3` 3` GT AT↑AC...5`	New England Biolabs
SapI	Restriktionsenzym 5`...GCTCTTC N↓NNN.....3` 3` CGAGAAGN NNN↑....5`	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	DNA-Ligase	Promega
CIP	Hydrolyse freier Phosphatgruppen	New England Biolabs
Phusion HF	<i>proofreading</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs
Q5 HotStart HF	<i>proofreading</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs
GoTaq Readymix	DNA-Polymerase	VWR
Trypsin	Serin Protease	Promega
Sortase A SrtA_{Δ25}	Transpeptidierungen	diese Arbeit
Sortase A SrtA_{Δ59}	Transpeptidierungen	diese Arbeit
Sortase A SrtA_{Δ59_CBD}	Transpeptidierungen	Bachelorarbeit Christian Bartz

Alle Enzyme wurden bei einer Reaktionstemperatur von 37° C verwendet.

3.5. Protein- und DNA-Standards

100 bp Ladder	NEB (Frankfurt a. M.)
1 kb DNA Ladder	Promega (Madison, USA)
Color Plus Prestained Proteinmarker	NEB (Frankfurt a. M.)

3.6. Kit-Systeme

IMPACT-TWIN	NEB (Ipswich, USA)
QIAquick Gel Extraction	QIAGEN (Hilden)
QIAquick PRC Purification	QIAGEN (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep	QIAGEN (Hilden)

3.7. Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> DH5 α :	<i>recA1</i> Δ <i>lacU169</i> ψ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Bethesda Research Laboratories
<i>Escherichia coli</i> ER2566:	F- λ - <i>fhuA2</i> [<i>lon</i>]; <i>ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11</i> ; Δ (<i>mcrC-mrr</i>)114:IS10; R(<i>mcr-73::miniTn10-TetS</i>)2; R(<i>zgb-210::Tn10</i>) (<i>TetS</i>) <i>endA1</i> [<i>dcm</i>] NEB (Frankfurt a. M.)

3.8. Expressionsvektoren

Tabelle 3.2: Expressionsvektoren

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
pET28a	Klonierungs- und Expressionsvektor, 5369 bp	NEB, Frankfurt a.M.
pTWIN2	Klonierungs- und Expressionsvektor, 7375 bp, Intein 1: Modifiziertes <i>Ssp</i> DnaB Intein, Intein 2: Modifiziertes <i>Mth</i> RIR1 Intein	NEB, Frankfurt a.M.
pPhoB ^{DBD} _WT	315 bp SapI-NdeI PhoB ^{DBD} -Fragment kloniert in pTWIN2 (PhoB AS 127-229)	Diplomarbeit Kathrin Wollschläger ^[99]
pPhoB ^{DBD} _E159A	PhoB ^{DBD} _WT E159 mutiert zu A	diese Arbeit
pPhoB ^{DBD} _E191A	PhoB ^{DBD} _WT E191 mutiert zu A	diese Arbeit
pPhoB ^{DBD} _W184A	PhoB ^{DBD} _WT W184 mutiert zu A	diese Arbeit
pPhoB ^{DBD} _R200A	PhoB ^{DBD} _WT R200 mutiert zu A	diese Arbeit
pPhoB ^{DBD} _R203A	PhoB ^{DBD} _WT R203 mutiert zu A	Diplomarbeit Kathrin Wollschläger ^[99]
pSrtA _{Δ59}	Sortase A aus <i>Staphylococcus aureus</i> , AS 60-206; kloniert in pET28	Prof. Dr. H. Ploegh (Withehead Institute, Cambridge, USA)
pSrtA _{Δ59} _CBD	SrtA _{Δ59} kloniert in pTWIN2 über NdeI und AgeI zum Fusionsprotein mit Chitin-Bindedomäne	Bachelorarbeit Christian Bartz
pMG ₂ A_PhoB ^{DBD} _LPSTG_H ₆ _Stop	PhoB ^{DBD} -Mutante mit mutiertem N-Terminus zu MGGA, C-terminaler Sortase-Erkennungssequenz (LPSTG) und His- <i>tag</i>	diese Arbeit

3.9. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide für die PCR und für die Bindungsstudien mittels CD- und SPR-Messungen wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Tabelle 3.3: Primer für PhoB^{DBD} Mutagenese-PCR

Bezeichnung	Mutation	Primer	Sequenz (5' → 3')
PhoB ^{DBD} _E159A	GAA zu GCA	mutE159A fwd	GGGCCGACAGCATTAAACTGCTGCAC
		mutE159A rev	CATCTCCAGCGGCTCTTCGCCCCG
PhoB ^{DBD} _W184A	TGG zu GCG	mutW184A fwd	GGAACAACTGTATGTGGAAGAC
		mutW184A rev	CGCGACGTGGTTTAAACAGCTGCT
PhoB ^{DBD} _E191A	GAA zu GCA	mutE191A fwd	GCAACCGCACGGTCGATGT
		mutE191A rev	CACATACAGTTAGTCCCCAGAC
PhoB ^{DBD} _R200A	CTG zu GCT	mutR200A fwd	GATGTCCACATTGCTCGCTGCGTAAA
		mutR200A rev	GACCGTGCGGCTCTCCACATACAC

Tabelle 3.4: Primer für PCR zur Klonierung von PhoB^{DBD} als bifunktionelles Substrat zur Sortase A Cyclisierung der Sortase A-Erkennungssequenz

Bezeichnung	Primer	Sequenz (5' → 3')
PhoB ^{DBD} _LPSTG_H ₆	NdeI_G ₂ _PhoB fwd	GGTGGTCATATGGGGGGGAAGAGGTGATTGAG
	SapI_PhoB_H ₄ rev	ATGATGATGATGAAAGCCGGTTGAAGGAGGATA
	SapI_PhoB_H ₆ rev	GGTGGTTGCTCTCCGCAATGATGATGATGATGATAA
PhoB ^{DBD} _LPSTG_H ₆ _Stop	LPSTG_Stop fwd	CATCATCATCATTAATGCGGAAGAGCAACC
	LPSTG_Stop rev	GGTTGCTCTCCGCAATGATGATGATGATG
MG ₂ A_PhoB ^{DBD} _LPSTG	MG ₂ A_PhoB fwd	GGTGGTCATATGGGGGGGCAGAGGTGATTGAG
	MG ₂ A_PhoB rev	GTGAGATGTCGGGTCGAGACTTAATCCCTGCAT
T7-Sequenzier Primer	T7 fwd	TAATACGACTCACTATAGGG

Tabelle 3.5: DNA-Oligonukleotide

Sequenzen der zur Interaktionsanalyse verwendeten DNA-Oligonukleotide, basierend auf der *pho box*-Sequenz des *pst*-Regulons. Dabei bedeutet **M** = Major groove (große Furche), **m** = minor groove (kleine Furche) und **x** = randomisierte Sequenz.

Name	Länge	Beschreibung	Sequenz (5'→3')
MmMm	24 bp	<i>pho box</i> -DNA mit zwei Bindestellen	CTGTCATAAACTGTCATATTCCT
MmXx	24 bp	<i>pho box</i> -DNA mit einer Bindestelle	CTGTCATAAACGAGGCAGCATCT
XxXx	24 bp	randomisierte Sequenz	CGAGGCAGCATACGGATCCGAGGC

3.10. Proteine und Peptide

Tabelle 3.6: Proteine und Peptide

Bezeichnung	Eigenschaften	Herstellung
PhoB^{DBD}_WT	Wildtyp DBD von PhoB (127-229)	Überexpression in <i>E. coli</i>
PhoB^{DBD}_E159A	WT Mutante Glutamat 159 zu Alanin	Überexpression in <i>E. coli</i>
PhoB^{DBD}_E191A	WT Mutante Glutamat 191 zu Alanin	Überexpression in <i>E. coli</i>
PhoB^{DBD}_W184A	WT Mutante Tryptophan 184 zu Alanin	Überexpression in <i>E. coli</i>
PhoB^{DBD}_R200A	WT Mutante Arginin 200 zu Alanin	Überexpression in <i>E. coli</i>
PhoB^{DBD}_R203A	WT Mutante Arginin 203 zu Alanin	Überexpression in <i>E. coli</i>
PhoB^{DBD}_LPSTG	WT Mutante mit Sortase Erkennungssequenz (LPSTG), N-term. His-tag und des C-term. Mutation MAV zu MGG	Überexpression in <i>E. coli</i>
MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG	WT-Mutante mit Sortase Erkennungssequenz (LPSTG), N-term. His-tag und C-term. Mutation MAVE zu MGGA	Überexpression in <i>E. coli</i>
SrtA_{Δ59}	trunkierte Sortase A ab AS 59	Überexpression in <i>E. coli</i>
SrtA_{Δ59}_CDB	Sortase-Mutante mit Chitin-tag	Überexpression in <i>E. coli</i>
G₂HF-Peptid (1)	Glycin-Nukleophil für Sortase Reaktion	Peptidsynthese
LPETG-Peptid (2)	Peptid mit Sortase Erkennungsequenz (LPETG)	Peptidsynthese

3.11. Puffer und Medien

Alle verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden mit Millipore Wasser angesetzt. Die Medien zur Kultivierung von Bakterien wurden autoklaviert, andere Puffer und Lösungen steril filtriert.

3.11.1. Bakterien Kultivierung

LB-Medium	1 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	1 % (w/v)	NaCl
		pH 7,0
LB-Agar	1 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl
	1,5 % (w/v)	Agar pH 7,0
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml	Ampicillin (Endkonz. 100 µg/ml)
Kanamycin-Stammlösung	60 mg/ml	Kanamycin (Endkonz. 60 µg/ml)
SOC-Medium	2 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₂
	20 mM	Glucose pH 7,0
MgCl₂-Lösung	100 mM	MgCl ₂
CaCl₂-Lösung	100 mM	CaCl ₂
IPTG-Stammlösung	1 M	IPTG (Endkonz. 0,5 mM)

3.11.2. Gelelektrophorese

1) Agarosegelelektrophorese:

10x DNA-Ladepuffer	70 % (w/v)	Saccharose
	100 mM	EDTA
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml	Ethidiumbromid
50x TEA-Puffer	2 M	Tris-HCl
	2 M	Essigsäure
	50 mM	EDTA
		pH 8,0

2) SDS-PAGE:

10x Elektrophoresepuffer	250 mM	Tris-HCl
	1,92 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
		pH 8,6
Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris-HCl pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
3x SDS-Ladepuffer	1,75 ml	0,5 M Tris-HCl (Sammelgelpuffer)
	1,5 ml	Glycerin
	5 ml	10 %ige SDS-Lösung
	0,5 ml	β -Mercaptoethanol
	0,5 ml	MPW (Millipore Wasser)
	1,5 ml	Bromphenolblau (gesätt. in 0,1 % EtOH)
Coomassie-Färbung	0,02 % (w/v)	Coomassiebrilliantblau G250
	5 % (w/v)	Aluminiumsulfat 14 Hydrat
	10 % (w/v)	Ethanol
	2 % (w/v)	<i>ortho</i> -Phosphorsäure

3.11.3. Proteinaufreinigung

Für die Proteinaufreinigung der exprimierten Proteine wurden folgende Puffer verwendet:

Aufreinigung mittels Chitin-Beads

B2-Lysepuffer	20 mM	Na-HEPES
	500 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	20 µM	PMSF
	0,2 % (v/v)	Tween 20
		pH 7,5

B2-Waschpuffer	20 mM	Na-HEPES
	500 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
		pH 7,5

B4-Elutionspuffer	20 mM	Na-HEPES
	500 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	50 mM	MESNA
		pH 8,5

Aufreinigung mittels HisTalon-Beads

S1-Lysepuffer	20 mM	Na-HEPES
	500 mM	NaCl
	20 µM	PMSF
	0,2 % (v/v)	Tween 20
		pH 7,5

S1-Äquilibrationspuff.	50 mM	Na ₂ HPO ₄
	300 mM	NaCl
		pH 7,4

S2-Waschpuffer	50 mM	Na ₂ HPO ₄
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
		pH 7,4

S3-Elutionspuffer	50 mM	Na ₂ HPO ₄
	300 mM	NaCl
	150 mM	Imidazol
		pH 7,4

3.11.4. CD-Messungen

CD-Phosphatpuffer	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	5 mM	NaCl
		pH 7,4

3.11.5. SPR-Messungen

SPR-Phosphatpuffer	100 mM	Na ₂ HPO ₄
	50 mM	NaCl
		pH 7,4
Regenerierungslösung	0,05 %	SDS in Laufpuffer

3.11.6. Sortase A-vermittelte Transpeptidierungen

AS-Reaktionspuffer	50 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	10 mM	CaCl ₂
		pH 7,5
AS-Lagerungspuffer	50 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	10 mM	CaCl ₂
	10 % (v/v)	Glycerin
		pH 7,5
BS-Puffer	20 mM	HEPES
	150 mM	NaCl
		pH 7,6
CaCl₂-Lösung (20x)	200 mM	CaCl ₂

3.11.7. Sonstige Puffer und Lösungen

DHB-Matrix	9 ml	DHB (10 g/L) in 20 % Acetonitril
	1 ml	Methoxysalicylsäure (10 g/L) in 50 % ACN
Sinapinsäure-Matrix	75 % (v/v)	Acetonitril
	0,1 % (v/v)	TFA
	10 mg/ml	Sinapinsäure
Tris-Puffer	10 mM	Tris-HCL pH 8,0
Tris-Puffer (Größenausschluss- Chromatographie)	50 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl pH 7,4
In-Gel-Verdau:		
TDL1	60 % (v/v)	Acetonitril
	0,1 % (v/v)	TFA
TDL2	50 % (v/v)	Acetonitril
TDL3	50 % (v/v)	Acetonitril
	50 mM	NH ₄ HCO ₃
TDL4	50 % (v/v)	Acetonitril
	10 mM	NH ₄ HCO ₃ pH 8,5

3.12. Computersoftware

Äkta Ettan:

Unicorn Version 5.01 (GE Healthcare, München)

Unicorn Steuersoftware für Äkta-Explorer System (GE Healthcare)

Auswertung von Daten:

OriginPro 9.1G (OriginLab Corporation)

GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA)

Berechnung des Molekulargewichts von Proteinen:

Expasy Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/)

CD-Messungen:

Jasco Spekttra Manager (Jasco, Groß Umstadt)

Darstellung von Proteinstrukturen:

UCF Chimera 1.5.3 (UCSF Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics)

DNA-Sequenzierung:

GATCViewer Version 1.00 (GATC Biotech, Konstanz)

RP-HPLC Analytik Software

ChromQuest Version 5.0 (Thermo Scientific, Waltham, USA)

Hitachi D-7000 Chromatography Data Station (Hitachi Merk, Darmstadt)

MestreNova (Mestrelab Research, S.L.)

MALDI-ToF-MS:

Voyager Instrument Control Panel Version 5.10

Data Explorer Version 4.0.0.0

(Applied Biosystems POMWIN, M. Meldal, Carlsberg Lab)

PMF-Analyse:

Bruker Daltonik flexControl Software 3.0 (Bremen)

mMass 5.0.1, open source Mass Spectrometry Tool (Martin Strohaln)

Mascot database search (Matrix Science)

SPR-Messungen:

BIAcore 3000 Control Software 3.0

BIAevaluation Version 3.2

(GE Healthcare, München)

Aminosäuren- und DNA-Sequenzen:

Expasy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>)

Vergleich von DNA-Sequenzen:

CLC Sequence Viewer 6.7 (CLC Bio, Arhus, Denmark)

Blast2 (NCBI)

4. Methoden

4.1. Mikrobiologische Methoden

4.1.1. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* in Flüssigkultur erfolgte in LB-Medium (3.11.1) mit geeignetem Antibiotikazusatz bei 150 rpm und 37 °C im Schüttelinkubator. Für die Kultivierung auf festen Medien wurden *E. coli* mit einem Glasspatel auf LB-Agarplatten (3.11.1) ausgestrichen und durch geeignetes Antibiotikum selektiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

4.1.2. Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Für die Expression rekombinanter Proteine oder zur Herstellung kompetenter Bakterien werden Bakterienkulturen benötigt, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Durch die photometrische Messung der Absorption bei 600 nm (OD_{600}) lässt sich die Wachstumskurve bestimmen. Eine Absorption von $OD_{600} = 0,1$ entspricht dabei einem Bakterientiter von $2 * 10^7$ Zellen/ml. Zur Bestimmung der logarithmischen Phase wurde die Absorption gegen die Zeit aufgetragen. In dieser Arbeit wurden Werte zwischen $A_{600} = 0,5 - 0,7$ für die exponentielle Wachstumsphase ermittelt und als Induktionszeitpunkt für die Expression von Proteinen angewandt.

4.1.3. Glycerinkulturen zur Lagerung von Bakterien

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt und bei -80 °C gelagert. Dazu wurden von einer Übernachtskultur 1,5 ml Bakteriensuspension entnommen und für 5 min bei $4000 * g$ und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 0,5 ml frischem LB-Medium resuspendiert, mit 0,5 ml Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.1.4. Herstellung kompetenter Bakterien

Durch Behandlung mit Magnesium- und Calciumchlorid können Bakterien wie *E. coli* bei niedrigen Temperaturen in die Lage versetzt werden, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen, diese Eigenschaft wird als kompetent bezeichnet. Die Herstellung der kompetenten *E. coli* DH5 α oder ER2566 erfolgte nach der Mehr-Ionentechnik von Kushner. ^[100] Hierzu wurde mit 1 ml aus einer frischen Übernachtskultur 200 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer Absorption von OD₆₀₀ = 0,6 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach zehn Minuten Inkubation auf Eis wurde die Kultur 5 min bei 4 °C und 3000 * g zentrifugiert und das Bakteriensediment mit 20 ml kalter Magnesiumchlorid-Lösung (MgCl₂, 100 mM) resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation von 5 min bei gleichen Parametern wurde das Bakteriensediment mit 10 ml gekühlter Calciumchlorid-Lösung (CaCl₂, 100 mM) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation und Resuspension mit 10 ml CaCl₂ wurde die Bakterienlösung mit 2 ml Glycerin versetzt und zur späteren Verwendung in Aliquots von je 100 μ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert. Die hergestellten kompetenten Bakterien wurden durch Transformation mit 50 ng zirkulären Kontrollplasmid auf ihre Transformationseffizienz überprüft. Bei den weiteren Transformationen wurden kompetente Bakterien mit einer Transformationseffizienz von $\sim 1 \cdot 10^8$ Transformanten pro 1 μ g Plasmid-DNA verwendet.

4.1.5. Transformation kompetenter Bakterien

Die hergestellten kompetenten *E. coli* DH5 α oder ER2566 wurden mit Plasmid-DNA, bzw. Ligationsansätzen, zur Herstellung neuer Mutanten transformiert. Im Allgemeinen wurden für die Transformation 100 μ l Aliquotes im Eisbad aufgetaut und mit 2 μ l Plasmid-DNA (50 – 100 ng/ μ l) oder 10 μ l Ligationsansatz versetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock von 42 °C für 45 sec werden die Bakterien zur Aufnahme der Plasmid-DNA und so zur Transformation gebracht. Eine anschließende direkte Abkühlung im Eisbad bricht die Aufnahme der DNA ab. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium (3.11.1) wurden die Bakterien 60 Minuten bei 37 °C und 180 rpm im Thermomixer (Eppendorf) zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz inkubiert. Anschließend wurden 250 μ l des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit Antibiotikumzusatz zur Selektion ausplattiert und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bewachsene Platten wurden als Flüssigkultur weiter kultiviert, um entweder zur Plasmidisolierung mit anschließender Sequenzierung zur Überprüfung auf positive Klone oder zur Lagerung als Glycerinkultur zu dienen.

4.1.6. Expression rekombinanter Proteine

Rekombinante Proteine wurden in *E. coli* ER2566 im größeren Maßstab exprimiert. Hierfür wurde antibiotikahaltiges LB-Medium (1,6 l) mit insgesamt 200 ml Übernachtskultur der Transformanten angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 rpm bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert ($A_{600} = 0,5 - 0,7$). Anschließend wurde durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonz. 0,5 mM) als Induktor die Expression des gewünschten rekombinanten Proteins induziert. Die Kultur wurde für vier weitere Stunden bei 30 °C inkubiert und anschließend die Bakterien durch 30 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 3000 * *g* geerntet. Alle verwendeten Medien und Puffer sind in 3.11.1 aufgeführt. Das Bakteriensediment wurde anschließend in 20 ml B2-Lysepuffer (Chitin-*tag* Proteine) oder S1-Lysepuffer (His-*tag* Proteine) resuspendiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren (Puffer siehe 3.11.3). Die Lysepuffer enthielten den Protease-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 20 μ M), um eine Degradation der Proteine durch Serinproteasen zu verhindern. Die Proteinsuspension wurde bis zur Aufreinigung für maximal vier Wochen bei - 80 °C gelagert.

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde das Kit-System QIAprep Spin Miniprep der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers verwendet. [101] Das Kit-System beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien. Größere Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt, die DNA bei hoher Salzkonzentration an eine Silica-Matrix gebunden und Verunreinigungen durch Waschen entfernt. Pro Aufreinigungsansatz wurden 10 ml Bakterienkultur eingesetzt. Die Elution erfolgte mit 30 - 50 µl Elutionspuffer unter niedriger Salzkonzentration.

4.2.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von DNA-Lösungen

Die Konzentration und Reinheit von wässrigen DNA-Lösungen wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm mit einem NanoDrop Spektrophotometer (PEQLAB) bestimmt. Nukleinsäuren zeigen bei 260 nm und Proteine bei 280 nm ein Absorptionsmaximum. Eine Absorption $A_{260} = 1,0$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA kann durch das Verhältnis der Absorption A_{260} zu A_{280} bestimmt werden. Der Quotient hochreiner DNA liegt bei 1,8, durch Verunreinigungen wie Proteine sinkt dieser Quotient, bei Werten über 1,9 kann die Lösung auch RNA enthalten.

4.2.3. Dimerisierung einzelsträngiger Oligonukleotide

Um synthetische Einzelstrang-DNA zu hybridisieren wurden je zwei komplementäre Einzelstränge in Tris-Puffer (3.11.7) gelöst, in einem Reaktionsgefäß zu einer Endkonzentration von jeweils 0,1 mM vereinigt und bei 100 °C inkubiert. Die Temperatur wurde langsam verringert, wodurch die Einzelstränge zu einem Doppelstrang hybridisieren. Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden anschließend bei - 20 °C gelagert.

4.2.4. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an spezifischen Erkennungssequenzen, zumeist palindromische Sequenzen, wobei je nach verwendetem Enzym an der Schnittstelle glatte (*blunt ends*) oder kohäsive (*sticky ends*) Enden mit einzelsträngigen Überhängen erzeugt werden. Diese Eigenschaften werden genutzt, um Vektoren zu analytischen Zwecken zu verdauen, sie für eine Ligation mit anderen Fragmenten vorzubereiten oder nach einer PCR die *template*-DNA zu entfernen. Im Allgemeinen wurden 0,1 – 1 µg Plasmid-DNA, 0,1 - 1 U Enzym und ein geeigneter Reaktionspuffer verwendet, um die DNA in 1 h bei der entsprechenden Temperatur vollständig zu verdauen. Eine Unit (U) ist als die Menge Enzym definiert, die benötigt wird um 1 µg λ-DNA in einer Stunde bei 37 °C in einem Reaktionsvolumen von 50 µl zu schneiden. Zum Teil wurden nach dem Verdau unerwünschte Fragmente durch Gelelektrophorese und -extraktion (siehe 4.2.6/ 4.2.7) abgetrennt.

4.2.5. Dephosphorylierung von DNA

Das Enzym CIP (*alkaline calf intestinal phosphatase*) spaltet hydrolytisch Phosphatgruppen am 5'-Ende eines DNA-Fragmentes, wodurch unerwünschte Religation von Vektoren, die nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurden oder *blunt ends* aufwiesen, vermieden wird. Dazu wurde 1 µg Vektor-DNA mit 10 U des Enzyms und dem entsprechenden Reaktionspuffer eine Stunde bei 37 °C zur Dephosphorylierung behandelt.

4.2.6. Agarosegelelektrophorese von DNA

Eine Auftrennung zur Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte mithilfe der Agarosegelelektrophorese, wobei der Grad der Auftrennung der DNA nach ihrer Größe von der Dauer der Elektrophorese, der Konzentration des Gels und der angelegten Spannung abhängig ist. ^[102] Durch Verwendung verschiedener Längenmarker (siehe 3.8) konnten die Größe und Reinheit der DNA-Fragmente bestimmt werden. Es wurden 1 - 2 %ige Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Je nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden DNA-Mengen von 0,1 bis zu 0,75 µg eingesetzt und vor dem Beladen des Gels mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V in horizontalen Gelelektrophoresekammern. Zum Anfärben der DNA-Banden wurde das Gel mit Ethidiumbromid-Lösung für 5 - 10 Minuten gefärbt und anschließend mit MPW gewaschen. Die Bandenmuster der DNA-Fragmente im Gel wurden bei einer UV-Bestrahlung (254-300 nm) auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert. (Pufferzusammensetzungen siehe 3.11.2)

4.2.7. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation von DNA-Fragmenten, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Herstellerprotokoll verwendet.^[103] Die entsprechende DNA-Bande wurde nach Agarosegelelektrophorese mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Danach wurde das Gelstück bei 50 °C gelöst, die DNA an eine Silica-Membransäule gebunden, durch Waschen gereinigt und im geeignetem Volumen Tris-Puffer (3.11.7) eluiert. Abschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. 4.2.2).

4.2.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein enzymatisches Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Ausgehend von der *template*-DNA, einer bekannten Gensequenz, wird ein gewünschtes DNA-Fragment mithilfe von komplementären kurzen Oligonukleotid-Fragmenten, den *primern*, und einer DNA-Polymerase spezifisch amplifiziert. Die Reaktion lässt sich in mehrere Schritte aufteilen, zuerst erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen *template*-DNA, anschließend lagern sich die *primer* an die komplementäre DNA an (*anealing*) und als letztes findet durch die DNA-Polymerase die Elongation der DNA statt. Durch Wiederholen dieser drei Schritte lassen sich DNA-Fragmente mit geeigneten hitzestabilen Polymerasen nahezu exponentiell amplifizieren. Zur Mutagenese eines Vektors wurden zwei zum Plasmid komplementäre *primer* mit der gewünschten Mutation entworfen, die anschließend in der PCR zu den mutierten DNA-Strängen amplifiziert werden. Nach der PCR wird durch einen Verdau mit dem Enzym DpnI die methylierte *template*-DNA abgebaut, so dass nur die neu synthetisierte und mutierte DNA verbleibt. Die in dieser Arbeit verwendeten *primer* sind in Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 aufgeführt. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde in einzelnen Fällen eine Gradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen *anealing*-Temperatur durchgeführt. Hierfür wurde der GoTaq Readymix der Firma VWR verwendet. Der Reaktionsansatz und das Programm für die Gradienten-PCR sind in Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 zusammengefasst. Nach Optimierung wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter Verwendung der Phusion DNA Polymerase (NEB, Frankfurt a. M.) oder der Q5 Hotstart HF Polymerase (NEB, Frankfurt a. M.) amplifiziert. Die entsprechenden Reaktionspuffer wurden zusammen mit den Polymerasen bezogen. Im Fall eines hohen GC-Gehalts oder langen Fragmentes wurde die Q5-Polymerase eingesetzt. Die Bedingungen und Reaktionsansätze für die Mutations-PCRs sind unten dargestellt (Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4).

PCR-Protokoll für Gradienten-PCR zur Bestimmung von *anealing*-Temperaturen:

Tabelle 4.1: Pipettierschema für Gradienten-PCR

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
GoTaq Readymix	45 µl	1x
<i>Template</i> -DNA	1 µl	50 ng
MPW	2 µl	auf 50 µl
<i>Primer</i> -Mix (5 µM)	2 µl	0,2 µM

Tabelle 4.2: Reaktionsbedingungen für Gradienten-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s
Denaturierung	95 °C	30 s
<i>Anealing</i>	Gradient (50-75 °C)	10 s
Elongation	68 °C	5 min
Finale Elongation	68 °C	10 min

PCR-Protokoll zur ortsgerichteten Mutagenese:

Tabelle 4.3: Pipettierschema für Mutations-PCR

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
5x Reaktionspuffer	10 µl	1x
dNTP's (10 mM)	1µl	200 µM
<i>Template</i> -DNA	1µl	50 ng
MPW	35 µl	auf 50 µl
Polymerase	0,5 µl	2 U
<i>Primer</i> -Mix (5 µM)	2,5 µl	0,25 µM

Tabelle 4.4: Reaktionsbedingungen für Mutations-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
Denaturierung	98 °C	10 s
<i>Anealing</i> ¹	61 °C	10 s
Elongation ²	72 °C	5 min
Finale Elongation	72 °C	10 min

Die Kontrolle auf eine erfolgreiche PCR erfolgte per Agarosegelelektrophorese (4.2.6). PCR-Ansätze mit DNA-Fragmenten erwarteter Größe wurden aufgereinigt und zur weiteren Klonierung verwendet.

4.2.9. Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Nach Durchführung einer PCR wurden die amplifizierten Fragmente unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit der Firma QIAGEN aufgereinigt. [103] Die Aufreinigung erfolgte laut Herstellerangaben. Auch hier beruht das Aufreinigungsprinzip auf Bindung der DNA an eine Silicamembran wie bereits bei der Präparation für Plasmid-DNA beschrieben (4.2.1). Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte mit 30 µl Elutionspuffer. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden nach Konzentrationsbestimmung (4.2.2) zur Ligation eingesetzt.

4.2.10. Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit Insert-DNA

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Expressionsvektoren wurde die T4-DNA Ligase (Promega) aus *E. coli* verwendet, die DNA-Enden unter ATP-Hydrolyse verknüpft. Bei den durchgeführten Ligationsreaktionen wurde ein molares Verhältnis von 1:3 Vektor- zu Insert-DNA (PCR-Fragment) verwendet, was ca. 100 ng Plasmid-DNA und 10 ng Insert-DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 10 x Ligase-Puffer entsprach und nach folgender Formel berechnet wurde:

$$Menge\ Insert\ (ng) = \frac{Menge\ Plasmid\ (ng) * Größe\ Insert\ (kb)}{Größe\ Plasmid\ (kb)} * Molares\ Verhältnis\ \frac{Insert}{Plasmid} \quad (4-1)$$

¹ Für jedes *primer*-Paar wurde eine geeignete *anealing*-Temperatur verwendet.

² Die Elongationszeit wurde je nach Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst.

Die Ligationenreaktion erfolgte ü.N. bei 4 °C. Zur Religationskontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert durchgeführt. Die durch die Ligation erhaltene zirkuläre Plasmid-DNA wurde in *E. coli* DH5α transformiert (4.1.5).

4.2.11. Identifizierung von Mutanten per DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA zur Bestimmung positiver Klone und Erfassung der genauen Sequenzen erfolgte bei der Firma GATC-Biotech (Konstanz), die die Plasmid-DNA nach der Methode von Sanger sequenziert (Kettenabbruchmethode).^[104]

Als Sequenzierproben wurde die Plasmid-DNA transformierter Bakterienkolonien aufgereinigt. Für alle Sequenzierungsproben eignete sich der T7-*primer* (Tabelle 3.3). Die erhaltenen Sequenzdaten wurden anschließend mit dem Computerprogramm Blast2 des *National Center for Biotechnology information* (NCBI) analysiert und mit den erwarteten Sequenzen abgeglichen (BLAST: *basic local alignment search tool*).

4.3. Biochemische Methoden

4.3.1. Aufschluss von Bakterienzellen (Zellyse)

Nach der Expression rekombinanter Proteine (4.1.6) wurden die Bakterienzellen lysiert, um die enthaltenen Proteine aufzureinigen zu können. Für den Aufschluss von Bakterien wurden die in 20 ml Lysepuffer gelagerten Bakteriensedimente durch zweimaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen lysiert. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde die Suspension zentrifugiert (30 min, 12000 x g, 4 °C) und der Überstand anschließend mit einem 0,2 µm Membranfilter (Whatman) filtriert. Das so erhaltene Lysat wurde je nach Protein-*tag* mit nachfolgenden Verfahren weiter aufgereinigt. Zur Kontrolle des Zellaufschlusses wurde eine Probe des Lysats mittels SDS-PAGE (4.3.4) überprüft.

4.3.2. Aufreinigung rekombinanter Proteine

4.3.2.1. Affinitätschromatographie mittels Chitin-Beads

Durch Affinitätschromatographie können Proteine auf der Basis reversibler Interaktion zwischen Protein und einem spezifischen Liganden, der an eine Chromatographiesäule gebunden ist, aufgereinigt werden. Die Aufreinigung von Proteinen, die eine Chitin-Bindedomäne als Affinitäts-*tag* besitzen, erfolgte durch Intein-vermitteltes Proteinspleißen mit Hilfe des pTWIN-Systems (siehe auch 1.3.1).^[105] Durch das pTWIN-System kann der Mechanismus des Proteinspleißens zur Aufreinigung von Fusionsproteinen genutzt werden, indem das Zielprotein in Fusion mit einem Intein und einem Affinitäts-*tag* kloniert wird (pTWIN2 basierende Plasmide). Das hier verwendete Affinitäts-*tag*, die Chitin-Bindedomäne (CBD), dient dabei der Aufreinigung durch Bindung an Chitin-Beads. Das Intein aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* des pTWIN2 Vektors ist durch Mutation derart verändert, dass eine Spaltung gezielt durch Zugabe von Thiolen induziert werden kann.^[66] Ein Vorteil dieser Aufreinigungsmethode ist, dass das Protein ohne Aufreinigungs-*tag* erhalten wird, welcher eine biologische Funktion stören könnte. Abbildung 4.1 zeigt eine schematische Darstellung der Intein-vermittelten Proteinaufreinigung mit Hilfe des pTWIN-Systems.

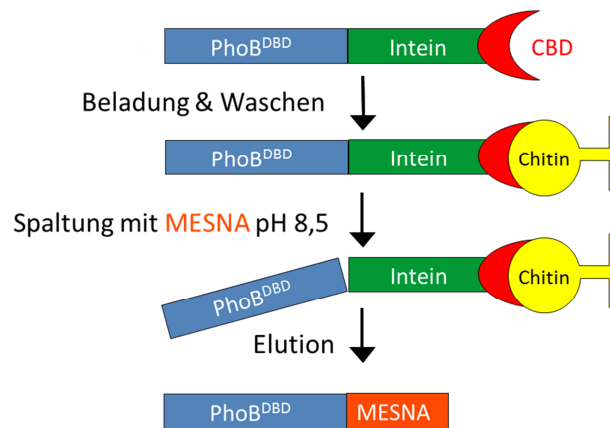


Abbildung 4.1: Intein-vermittelte Proteinaufreinigung

Schematische Darstellung der Intein-vermittelten Proteinaufreinigung von PhoB^{DBD}. Nach Bindung über die CBD des Fusionsproteins an Chitin-Beads und Waschen zum Entfernen von Verunreinigungen wurde die DBD des PhoB-Proteins durch einen MESNA-Puffer eluiert.

Die verwendeten Puffer dieser Aufreinigungsmethode sind in 3.11.3 beschrieben. Für die Aufreinigung wurde eine Chromatographiesäule (GE Healthcare) mit 5 ml Chitin-Beads (NEB, Frankfurt a. M.) beladen und mit dem zehnfachen Säulenvolumen B2-Waschpuffer (50 ml) mit 1 ml/min äquilibriert. Zur Regulierung des Auftragsvolumens und -Schnelligkeit wurden die Puffer mit Hilfe einer Spritzenpumpe (KD Scientific) appliziert. Das filtrierte Zelllysate wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Säulenmatrix aufgetragen und die beladenen Beads anschließend mit 50 ml B2-Waschpuffer (1 ml/min) zur Entfernung von Verunreinigungen gewaschen. Für die Elution wurde 5 ml B4-Elutionspuffer (0,5 ml/min) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Abspaltung des rekombinanten Proteins erfolgte durch das Thiolreagenz MESNA (2-Mercaptoethansulfonat-Natrium, 50 mM) im B4-Elutionspuffer. Durch weiteres Auftragen des B4-Elutionspuffers wurden Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen und per Bradford-Schnelltest (4.3.3) auf ihren Proteingehalt überprüft. Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden vereinigt und zur weiteren Verwendung dialysiert (4.3.5). Der Erfolg der Expression und der Aufreinigung wurde per SDS-PAGE (4.3.4) und MALDI-ToF-MS (4.3.11.1) überprüft.

4.3.2.2. Affinitätschromatographie mittels HisTalon-System

Proteine mit einem Hexahistidin-*tag* (His-*tag*, pET28A basierende Vektoren) wurden durch Metallaffinitätschromatographie (IMAC, *immobilized metal ion affinity chromatography*) mit HisTalon-Beads aufgereinigt. Die His-*getaggten* Proteine binden spezifisch über die Histidine durch Bildung eines Chelat-Komplexes mit den Cobalt-Ionen des Säulenmaterials (HisTalon-Beads). Die spätere Elution erfolgte unter hohen Imidazol-Konzentrationen, wodurch das Histidin aus dem Chelat-Komplex kompetitiv verdrängt wird. Das eluierte Protein enthält, im Gegensatz zur Aufreinigung mit dem pTWIN-System, nach der Aufreinigung immer noch die *tag*-Sequenz. Die verwendeten Puffer sind in 3.11.3 beschrieben. Bei dieser Methode wurde eine Chromatographiesäule (GE Healthcare) mit 1 ml TALON Metal Affinity Resin Beads (Clontech) beladen und mit zehnfachem Säulenvolumen (10 ml) S1-Elutionspuffer und 1 ml/min äquilibriert. Das Auftragen der Proteinlösung erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml S1- und 20 ml S2-Puffer mit 1 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte direkt durch Auftragen von 8 ml Imidazol haltigem S3-Elutionspuffer (0,5 ml/min). Auch hier wurden die aufgefangenen Fraktionen von je 1 ml mit dem Bradford-Schnelltest (4.3.3) auf ihren Proteingehalt überprüft und die Protein enthaltenen Chargen vereinigt und dialysiert (4.3.5). Der Erfolg der Expression und der Aufreinigung wurde ebenfalls per SDS-PAGE (4.3.4) und MALDI-ToF-MS (4.3.11.1) überprüft.

4.3.2.3. Größenausschluss-Chromatographie

Teilweise wurde nach einer Proteinaufreinigung über den Fusions-*tag* zusätzlich eine Größenausschluss-Chromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) mit einem Äkta Explorer System (GE Healthcare) durchgeführt, um eine höhere Reinheit der Proteinlösungen zu erreichen. Die Größenausschluss-Chromatographie ist eine Art der Flüssigkeitschromatographie, bei der Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Volumen getrennt werden. Der Trennungseffekt beruht auf dem unterschiedlichen Diffusionsvolumen unterschiedlich großer Moleküle. Die stationäre Phase besteht dabei aus porösen Polymeren, wie quervernetztes Dextran, in das kleine Moleküle eindringen können und dadurch ein größeres Diffusionsvolumen besitzen. Dies resultiert in einer längeren Diffusionszeit und einer späteren Elution der kleinen Moleküle.

In dieser Arbeit wurden Proteine durch Diffusion über eine stationäre Phase aus quervernetzter Agarose-Dextran-Matrix einer Superdex 75 Säule (GE Healthcare) aufgetrennt. Das Äkta-Explorer-System bestand aus einer Pumpe, einem Injektionssystem, der Trennsäule, verschiedenen Detektoren, Fraktionssammler und der Unicorn Steuerungs-

software (GE Healthcare). Bevor das Protein aufgetragen wurde, ist die Säule mit einem Tris-Puffer (3.11.7) für eine Stunde bei 0,5 ml/min äquilibriert worden. Über einen Injektionsloop ist anschließend die Proteinprobe (500 µl) appliziert worden. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min, wobei Fraktionen mit einem Fraktionssammler aufgefangen wurden. Unter Verwendung eines UV-Detektors und der Unicorn Software konnte über die gemessene UV-Absorption bei $\lambda = 280$ nm diejenigen Fraktionen bestimmt werden, die Proteine enthielten. Per SDS-PAGE (4.3.4) wurde überprüft, in welchen Fraktionen sich das aufgereinigte Protein befand und diese anschließend vereinigt.

4.3.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur schnellen und quantitativen Bestimmung des Proteingehalts in Lösungen, z.B. bei der Proteinaufreinigung, wurden Protein enthaltende Fraktionen mit einem Bradford Schnelltest ermittelt. Es wurden 5 µl jeder Proteinfraction mit 250 µl Bradfordfärbelösung (Applichem) versetzt, anhand der Intensität der Blaufärbung der Proteingehalt abgeschätzt und Fraktionen mit signifikantem Proteingehalt vereinigt. Qualitativ wurde der Proteingehalt photometrisch mit einem NanoDrop Spektrophotometer (Peqlab) bestimmt, indem die Absorption bei 280 nm (A_{280}) gemessen wurde. Eine A_{280} von 1,0 entspricht einer Konzentration von 1 mg/ml Protein.

4.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Unter Verwendung der diskontinuierlichen SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nach Lämmli lassen sich Proteine aufgrund ihrer verschiedenen Molekulargewichte unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch voneinander trennen.^[106] Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes SDS und erhalten eine negative Ladung die zu ihrem Molekulargewicht proportional ist, wodurch sie bei Anlegen einer elektrischen Spannung in der Gelmatrix aufgetrennt werden. Die Gelmatrix besteht aus einem weitporigen 4 %igem Polyacrylamid-Sammelgel, pH 6,8 und einem engporigen 12 %igem Polyacrylamid-Trenngel mit dem pH-Wert von 8,8 (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 4.5). Dies bezweckt, dass die Proteine gleichmäßig langsam in das Sammelgel einlaufen und im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Proteinproben wurden zum Denaturieren mit β -Mercaptoethanol-haltigem 3 x SDS-Proteinladepuffer (3.11.2) versetzt und durch 5 min bei 90 °C im Thermoschüttler inkubiert.

Die Elektrophorese erfolgte für etwa zehn Minuten bei 60 V und für weitere 2 - 3 h bei 100 V in einem mit SDS-Laufpuffer gefülltem vertikalen Mini-Elektrophorese System (Bio-Rad). Als Protein-Molekulargewichtsmarker (3.8) wurde ein gefärbtes Proteingemisch aus Proteinen definierter Größe aufgetragen. So konnte das Proteinbandenmuster der Größe in Kilo Dalton (kDa) zugeordnet werden. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden im Gel durch eine Coomassiefärbelösung (3.11.2) angefärbt. Dazu wurde das Gel mit MPW gewaschen, mit der Färbelösung kurz aufgekocht und weitere 30 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel über Nacht mit MPW gewaschen, um die Hintergrundfärbung zu entfernen. Die Dokumentation erfolgte mit dem LAS-3000 Imaging System (Fujifilm).

Tabelle 4.5: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Lösungen	Trenngel (18 %)	Sammelgel (18 %)
MPW	2,1 ml	2,89 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	1,26 ml
10 % SDS	100 µl	50 µl
40 % Acrylamid/Bisacrylamid 29/1	4,5 ml	0,5 ml
1,5 % APS	0,8 ml	0,3 ml
TEMED	5 µl	5 µl

4.3.5. Umpufferung von Proteinlösungen mittels Dialyse

Die nach den oben genannten Aufreinigungsmethoden erhaltenen Proteinlösungen wurden je nach weiterem Verwendungszweck gegen verschiedene Puffer dialysiert um hohe Imidazol-, MESNA- oder Salzkonzentrationen zu senken. Die Proteine wurden entweder für CD- und SPR-Messungen oder als Reaktionsedukte für Sortase A-Transpeptidierung eingesetzt. Dazu wurden 3 - 8 ml aufgereinigte Proteinlösung in eine SnakeSkin Dialyse Membran (Pierce) pipettiert und gegen 4 l des jeweiligen Puffers unter leichtem Rühren über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die entsprechenden Dialysepuffer sind in 3.11.3 aufgeführt.

4.3.6. Entsalzung von Proteinlösungen per ZipTip Spitzen

Um Proteine in Lösung für MALDI-ToF-MS Untersuchungen vorzubereiten, wurde zur Entsalzung der Proben ZipTip C₁₈ (Millipore) Pipettenspitzen verwendet. Die ZipTips wurden durch siebenmaliges Auf- und Abpipettieren zuerst mit 10 µl Acetonitril äquilibriert und anschließend mit 10 µl der Proteinlösung beladen. Zur Entsalzung wurde ebenfalls durch siebenmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 50 % wässrigen Acetonitril-Lösung und einer 0,1 % wässrigen Trifluoressigsäure-Lösung (TFA) gewaschen. Die Proteine wurden anschließend mit 4 µl Sinapinsäure-Matrix eluiert und auf einen Probenträger zur Cokristallisation aufgebracht. Weiterhin wurden auch Peptid-Lösungen mit diesem Verfahren für MALD-ToF-MS Untersuchungen vorbereitet. Lediglich die Elution wurde hier anstatt mit Sinapinsäure- mit einer 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) -Matrix durchgeführt. (Zusammensetzung Matrices 3.11.7)

4.3.7. Aufkonzentrieren von Proteinlösungen mit dem Vivaspin-System

Mit den Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin 20 (GE Healthcare) wurden Proteinlösungen für CD- und SPR-Messungen aufkonzentriert. Vivaspin 20 besitzt eine vertikale Polyethersulfon-Zwillingsmembran mit einer molekularen Ausschlussgrenze (MWCO, *molecular weight cut off*) von 5 kDa und einen Auslaufschutz, der eine lange Zentrifugation ohne Trockenlaufen ermöglicht. Zur Aufkonzentration wurde die gesamte Proteinlösung nach Dialyse (3-8 ml) in das Vivaspin-Röhrchen gegeben und bei 4000 x g und 4 °C so lange zentrifugiert, bis das Volumen der Lösung soweit verringert war, dass die gewünschte Konzentration erreicht wurde.

4.3.8. Tryptischer In-Gel-Verdau von Proteinen

Zur Identifizierung von Proteinen per *peptide mass fingerprinting* (PMF) wurde zur Probenvorbereitung ein In-Gel-Verdau für die anschließende massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Die Proteine wurden vor dem Verdau gelelektrophoretisch durch SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und die zu untersuchenden Proteinbanden ausgeschnitten. Anschließend folgte der Verdau der Proteine in kleinere Peptidfragmente mit Hilfe der Protease Trypsin. Diese spaltet dabei spezifisch C-terminal nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, sofern nicht die Aminosäure Prolin folgt. Die so erhaltenen Proteinfragmente können massenspektrometrisch untersucht und mittels PMF analysiert werden.

Für den tryptischen In-Gel-Verdau wurden Proteinbanden aus dem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten, in ein vorbehandeltes Reaktionsgefäß gegeben und gegebenenfalls zerkleinert. Vor Verwendung wurden die Reaktionsgefäße mit einer Acetonitril-TFA-Lösung zur Entfernung von Weichmachern behandelt, da diese bei der späteren MS-Analyse stören würden. Dazu wurden die Gefäße mit 500 µl TDL1 Lösung für mehrere Stunden gewaschen und über Nacht getrocknet. Die Zusammensetzung der verwendeten TDL-Lösungen ist in Abschnitt 3.11.7 beschrieben. Zur Entfärbung der Gelstücke wurde nacheinander mit drei verschiedenen Acetonitril-Lösungen (TDL2, TDL3 und TDL4) für jeweils 30 min bei RT unter leichtem Schütteln gewaschen und der Überstand jedes Mal verworfen. Die Trypsin-Lösung wurde aus lyophilisiertem Trypsin (Promega) und dem mitgelieferten Puffer (1 µg/µl) hergestellt und diese für 15 min bei 30 °C im Thermomixer aktiviert. Anschließend wurde 1 µl der aktivierten Trypsin-Lösung mit 14 µl einer Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (10 mM) versetzt. Mit dieser Trypsin-Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (15 µl) wurden die Gelstücke versetzt und 10 min bei RT zum Verdau in kleinere Peptidfragmente inkubiert. Der Reaktionslösung wurde gegen ein Eintrocknen der Gelstücke ~ 20 µl Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung zugefügt und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht weiter inkubiert. Die durch diese Methode erhaltenen Peptidfragmente wurden entweder direkt für die massenspektrometrische Analyse mit DHB-Matrix aufgetragen oder bei - 20 °C gelagert.

4.3.9. Mikrowellenunterstützte Festphasen-Peptidsynthese (SPPS)

Die Synthese von Peptiden wurde mit Hilfe der Festphasen-Peptidsynthese (SPPS, *solid phase peptid synthesis*) nach Merrifield durchgeführt. [65] Bei der ursprünglichen Methode von Merrifield werden Aminosäuren an einem Harz (feste Phase) einzeln, entgegengesetzt zur natürlichen ribosomalen Synthese, vom C- zum N-Terminus aneinander gekuppelt. Die Bindung des Peptids an ein Harz erlaubt dabei durch einfache Filtration die Abtrennung von überschüssigen Reaktionspartnern und löslichen Reagenzien während der Peptid-elongation. Die Methode von Merrifield wurde so weit optimiert, dass automatisierte, mikrowellen-unterstützte Systeme die Synthese von Peptiden in kürzester Zeit und in hohen Ausbeuten und Reinheit erlaubt. [107] Auch ist die Synthese bis zu 75 Aminosäuren langer und schwieriger Peptidsequenzen durch die Verwendung der Mikrowellen-Technik deutlich verbessert. [108]

Durch den Einsatz spezieller Schutzgruppen an den Aminosäuren erfolgt die Kupplung effizient und mit wenigen Nebenprodukten. Die Anforderungen an die Schutzgruppen beinhalten neben dem temporären Schutz des Aminoterminus der Aminosäuren auch eine möglichst orthogonale, semipermanente Schützungen der funktionellen Seitenkettengruppen, um ihre Reaktion mit anderen Aminosäuren zu verhindern. Die N-terminale Schutzgruppe muss einerseits nach der Kupplung selektiv entschützt werden können, um weitere Peptidbindungen zu ermöglichen, andererseits müssen die Seitenketten geschützt bleiben, um Nebenreaktionen zu vermeiden. Eine orthogonale Schutzgruppen-Strategie ermöglicht durch Verwendung verschiedener Schutzgruppen-Typen den Einsatz unterschiedlicher Abspaltreagenzien, so dass die Schutzgruppen einzeln und in beliebiger Reihenfolge abspaltbar sind. Die beiden wichtigsten Schutzgruppen-Strategien sind die Boc/Bzl- und die Fmoc/tBu-Techniken (Abbildung 4.2). [109]

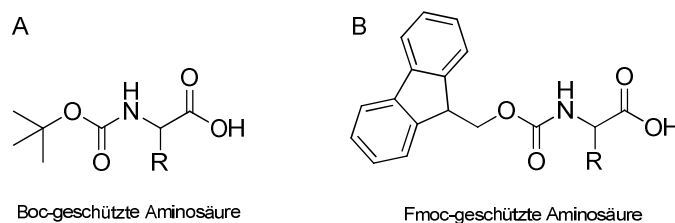


Abbildung 4.2: Temporäre Schutzgruppen der N^α-Aminofunktion

A Boc-geschützte Aminosäure für die Boc/Bzl Schutzgruppenstrategie. **B** Fmoc-geschützte Aminosäure für die Fmoc/tBu Schutzgruppenstrategie. (R = Seitenkette einer beliebigen Aminosäure)

Bei der Boc/Bzl-Strategie wird die N α -Aminofunktion als Carbamat mit einer *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe (Boc) geschützt. Diese Schutzgruppe ist säurelabil und kann mit Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten werden. Die Seitenkette wird mit einer Benzyl-Gruppe (Bzl) geschützt, die durch katalytische Hydrierung oder Fluorwasserstoff (HF) abgespalten wird. Diese beiden Schutzgruppen sind orthogonal zueinander, wobei die Orthogonalität auf den unterschiedlichen Säurelabilitäten beruht und die Schutzgruppen dadurch meistens stabil gegenüber dem jeweils anderen Abspaltreagenz sind.

Mehr Flexibilität in der Auswahl der Seitenketten-Schutzgruppen und mehr Spezifität beim Entschützen des N α -Terminus bietet die Fmoc/tBu-Strategie, die in dieser Arbeit angewendet wurde. [110] Der Schutz der N α -Aminogruppe erfolgt hier durch eine basenlabile 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe (Fmoc). Die Entschützung findet unter milden Bedingungen durch ein sekundäres Amin wie Piperidin über eine β -Eliminierung (E1cB-Mechanismus, siehe Abbildung 4.3) statt, wobei Dibenzofulven und ein Carbamat-Anion entstehen. Letzteres zerfällt zum freien Peptid und CO₂. Das Piperidin reagiert dabei auch als *scavenger* des entstandenen Dibenzofulvens und setzt es zu einem Addukt um, welches Licht der Wellenlänge $\lambda = 290$ nm absorbiert. Dies ermöglicht eine Quantifizierung der Menge an entschützter Aminosäure zur Berechnung der Harzbeladung. [109] Die Seitenketten werden bei der Fmoc/tBu-Strategie durch basenstabile, orthogonale Gruppen wie *tert*-Butyl (tBu) oder Triphenylmethyl (Trt) geschützt, die säure-vermittelt durch TFA abgespalten werden können.

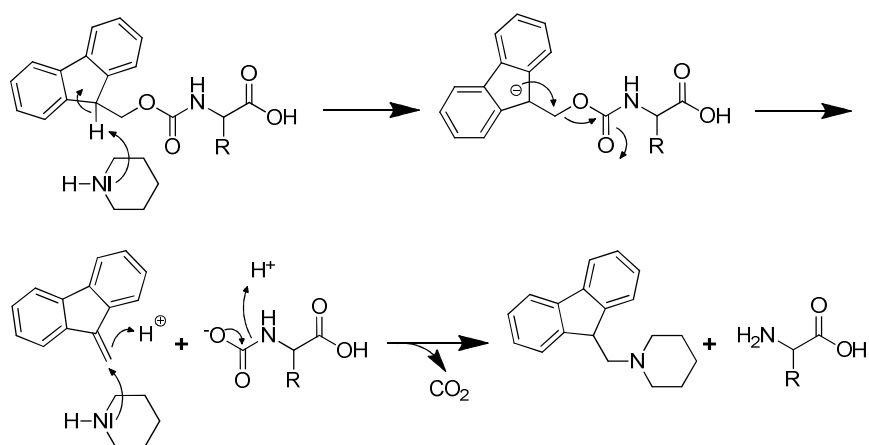


Abbildung 4.3: E1cB-Mechanismus zur Entschützung Fmoc-geschützter Aminosäure mit Piperidin

Die Entschützung von Fmoc-geschützten Aminosäuren erfolgt per β -Eliminierung, wie der hier dargestellte E1cB-Mechanismus. Das entstehende Nebenprodukt, Dibenzofulven, wird durch Piperidin als *scavenger* abgefangen und das freie Peptid wird abgespalten. (R = Seitenkette einer beliebigen Aminosäure)

Bei der SPPS muss für jede neue Kupplung die Carboxylgruppe der nächsten, N^α -geschützten Aminosäure aktiviert werden. Dies wird durch Kupplungsreagenzien wie O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) erreicht, die in Gegenwart einer Base wie Diisopropylethylamin (DIPEA) einen Aktivester mit der freien Aminosäure bilden. Die N^α -geschützte Aminosäure bildet mit TBTU ein O-Acylisoharnstoffderivat als intermediären Aktivester, welcher dann vom Benzotriazol nucleophil angegriffen wird und unter Bildung von N,N,N',N'-Tetramethylharnstoff in einen finalen Aktivester umgesetzt wird. Dieser kann anschließend von der entschützten N-terminalen Aminogruppe des am Harz befindlichen Peptids nucleophil am Carbonylkohlenstoff-Atom angegriffen werden, wodurch eine neue Peptidbindung entsteht. Die Aktivierung von Aminosäuren durch TBTU und DIPEA ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

Im Gegensatz zu Carbodiimiden, die auch zur Aktivierung der Carbonylfunktion verwendet werden, entstehen mit Uronium-Reagenzien wie TBTU besser lösliche Harnstoff-Derivate als Nebenprodukte. Auch können mit der TBTU/ DIPEA-Aktivierung Nebenreaktionen wie die Racemisierung durch Oxazolombildung vermieden werden, die bei der Verwendung von Carbodiimiden auftreten kann. [109]

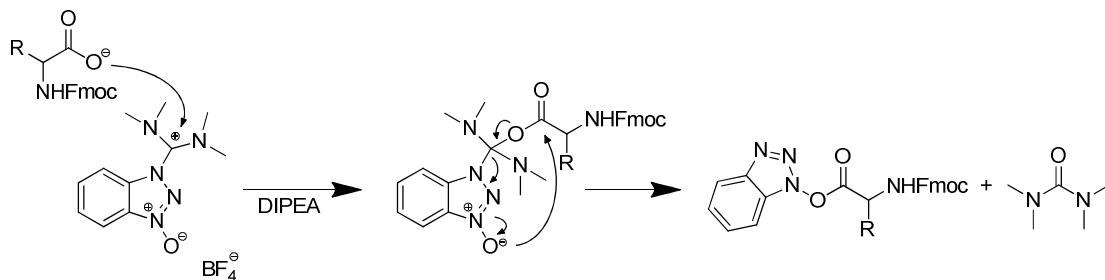


Abbildung 4.4: Aktivierung der Carbonylfunktion einer Aminosäure mit TBTU und DIPEA

Aktivierung der Carbonylfunktion durch nucleophilen Angriff von TBTU, Umlagerung zum Aktivester und Abspaltung eines löslichen Harnstoffderivats. (R = Seitenkette einer beliebigen Aminosäure)

Zu Beginn der Synthese wird die erste Aminosäure über den Carboxyterminus an funktionalisierte Polystyrol-Harze gebunden. Ein typisches Harz für die Fmoc/tBu-Strategie ist das sogenannte Barlos-Harz (Abbildung 4.5).

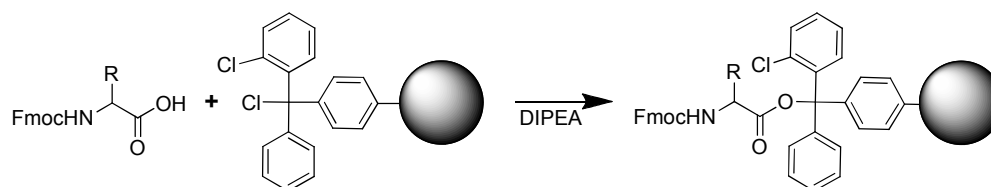


Abbildung 4.5: Beladung des 2-Chlortrityl-Harzes mit einer Fmoc-geschützter Aminosäure

(R = Seitenkette einer beliebigen Aminosäure)

Wenn die Synthese an einem säurelabilen 2-Chlortrityl-Harz durchgeführt wird, kann das Peptid am Ende der Synthese mit TFA vom Harz abgespalten und gleichzeitig die säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen (tBu, Trt) entfernt werden. ^[111]

4.3.9.1. Synthese des G₂HF-Peptids

Das Peptid G₂HF **1** mit der Aminosäuresequenz H-Gly-Gly-His-Phe-OH sollte als Glycin-Nukleophil bei Sortase A-Testreaktionen eingesetzt werden. Zuerst wurde 1 g 2-Chlortrityl-Harz für einen Synthesemaßstab von 1 mmol mit drei Äquivalenten der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure Phenylalanin (Fmoc-Phe-OH, 1,162 g, 3 mmol) beladen. Hierfür wurde das Harz mit der Aminosäure in frisch destilliertem DCM (Dichlormethan) und sechs Äquivalenten DIPEA (1,027 ml, 6 mmol) zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Argon geschüttelt. Anschließend wurde das beladene Harz abfiltriert und dreimal mit Dimethylformamid (DMF) und dreimal mit DCM gewaschen. Zur Absättigung nicht besetzter Bindungsstellen wurde das Harz 30 min mit Methanol inaktiviert und wiederum die oben genannten Waschschrte wiederholt. Nach Trocknung über Nacht im Exsikkator wurde der Beladungsgrad des Harzes bestimmt. Hierfür wurde 1 mg Harz mit 3 ml Abspaltlösung (20 % Piperidin in DMF) versetzt und bis zur konstanten Absorption inkubiert. Durch das Piperidin wird die Fmoc-Schutzgruppe der Aminosäure entfernt. Das dabei entstehende Dibenzofulven-Piperidin-Addukt absorbiert bei $\lambda = 290$ nm, wodurch sich nach folgender Gleichung die Beladung quantifizieren lässt:

$$\text{Harzbeladungsgrad: } \frac{A_{290}}{m_{\text{Harz}} \cdot 1,65} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{mg Harz}} \right] \quad (4-2)$$

Die weitere Synthese des Peptides **1** erfolgte mittels automatisierter, mikrowellenunterstützter SPPS mit einem Liberty Automated Microwave Peptid Synthesizer der Firma CEM (Kamp-Lintford). Die Kupplungen erfolgten sukzessiv mit dem Peptid-Synthesizer, wobei alle Schritte mit einer Mikrowellenleistung von 20 W und bei einer Maximaltemperatur von 75 °C durchgeführt wurden. Die benötigten Lösungen wurden mit DMF angesetzt. Für einen Synthesemaßstab von 0,25 mmol wurde die entsprechende Menge des Fmoc-Phe-OH beladenen Harzes (0,890 g, 0,25 mmol, Beladungsgrad 0,281 mmol/g) und der Fmoc-geschützten Aminosäuren Fmoc-Gly-OH und Fmoc-His-(Trt)-OH, jeweils als 0,2 molare Lösungen in DMF, eingesetzt. Je fünf Äquivalente der jeweiligen Aminosäure wurde für die entsprechende Kupplungsreaktion verwendet. Als Aktivator der Carbonylfunktion der Aminosäuren wurden jeweils fünf Äquivalente TBTU (1 ml, 0,5 M Lösung in DMF) und als entsprechende Base zehn Äquivalente DIPEA (0,5 ml, 2 M in 1-Methyl-2-pyrrolidon, NMP) eingesetzt. Die Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit einer Piperidin-Lösung (7 ml, 20 % Piperidin in DMF).

Nach der Synthese wurde das Abspalten und Entschützen des fertigen Peptids manuell durchgeführt. Dazu wurde das Harz zweimal mit Dichlormethan (je 20 ml) gewaschen und anschließend mit 6 ml einer Abspalllösung von aus 95 % TFA und 2,5 % Triisopropylsilan (TIS) in MPW (19 ml TFA, 0,5 ml TIS, 0,5 ml MPW) unter gelegentlichem Rühren für eine Stunde inkubiert. Die Lösung, welche das abgespaltene Peptid enthält wird, durch Absaugen vom Harz getrennt. Nach der Entschützung wurde das Volumen der erhaltenen Peptid-Lösung im Vakuum auf wenige Milliliter verringert, mit Acetonitril (ACN) versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

Die Menge des Rohproduktes wurde ausgewogen und der Erfolg der Synthese mit Hilfe von MALDI-ToF-MS überprüft. Anschließend wurde das Peptid **1** per präparativer RP-HPLC aufgereinigt und mittels analytischer RP-HPLC (4.3.10) und MALDI-ToF-MS (4.3.11.1) analysiert.

4.3.9.2. Analytik synthetisierter Peptide

G₂HF-Peptid (1):

Aminosäuresequenz: H-Gly-Gly-His-Phe-OH

Summenformel: C₁₉H₂₄N₆O₅

Molare Masse: 416,18 g/mol

Analytische RP-HPLC: t_R = 3,8 min (Methode 3)

Ausbeute: 18,2 mg, 43,7 μmol, 17,5 %

MS (MALDI-ToF, pos. Ionen, DHB-Matrix):

Berechnete Masse: m/z = 417,18 [M+H]⁺, 439,17 [M+Na]⁺, 478,27 [M+K]⁺

Gemessene Masse: m/z = 417,70 [M+H]⁺, 439,75 [M+Na]⁺

LPETG Peptid (2):

Synthetisiert von Christian Bartz im Rahmen seiner Bachelorarbeit. ^[112]

Sequenz: H-Ala-Gly-Leu-Pro-Glu-Thr-Gly-Glu-Glu-Asn-Pro-Phe-OH

Summenformel: C₅₅H₈₁N₁₃O₂₁

Molare Masse: 1259,57 g/mol

Analytische RP-HPLC: t_R = 7,2 min (Methode 3)

Ausbeute: 111 mg, 81 μmol, 32 % (Christian Bartz)

MS (MALDI-ToF, pos. Ionen, DHB-Matrix):

Berechnete Masse: m/z = 1259,57 [M+H]⁺, 1282,56 [M+Na]⁺, 1298,67 [M+K]⁺

Gemessene Masse: m/z = 1259,81 [M+H]⁺, 1282,17 [M+Na]⁺,

MS (ESI, neg. Ionen):

Berechnete Masse: m/z = 1258,57 [M-H]⁻

Gemessene Masse: m/z = 1258,7 [M-H]⁻

4.3.10. Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Zur Analyse und Präparation von Peptiden wurde RP-HPLC (*reversed phase high performance liquid chromatography*) durchgeführt. In dieser Arbeit wurde eine Umkehrphasen-Chromatographie unter Verwendung einer hydrophoben stationären Phase auf Silicagel Basis und einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril als polarer mobiler Phase eingesetzt (siehe Tabelle 4.6). Die Trennung des Analyten erfolgt aus der unterschiedlichen Wechselwirkung der Probe mit der stationären und mobilen Phase. Dabei interagieren unpolare Proben stärker mit dem Säulenmaterial, wodurch eine längere Verweildauer und somit eine höhere Retentionszeit in Vergleich zu einer polaren Probe resultiert. Durch die Verwendung eines geeigneten Gradienten des Lösemittelgemisches können auch Stoffe mit geringen Unterschieden in der Polarität getrennt werden.

Zur Aufreinigung synthetisierter Peptide wurde ein präparatives System der Firma Hitachi Merk (Darmstadt) und einer Jupiter Proteo Säule (10 μm C12 90 Å, Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet (siehe auch 3.1). Die Rohprodukte der Peptidsynthese wurden in einem minimalen Volumen eines Wasser-Acetonitril-TFA-Gemisch gelöst und das Retentionsverhalten über die Absorption bei $\lambda = 220 \text{ nm}$ überwacht. Die verwendete Laufzeit und die Gradienten der Laufmittel sind in Tabelle 4.7 aufgelistet.

Mit Hilfe der analytischen RP-HPLC wurde die Reinheit der Peptide untersucht. Dafür wurde ein Accela Flüssigchromatographie System der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) und einer Jupiter Säule (5 μm C18 300 Å, Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet. Der verwendete Laufmittel-Gradient und die Laufzeiten sind in Tabelle 4.7 aufgelistet. Die Retentionszeiten der Peptide wurden in Spektren der Absorption bei $\lambda = 220 \text{ nm}$ aufgezeichnet.

Für die Reaktionskontrolle der Sortase A-Transpeptidierungen wurde ebenfalls das analytische RP-HPLC System der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) verwendet. Es wurden jeweils 15 μl eines Reaktionsansatzes pro RP-HPLC-Lauf eingesetzt und das Retentionsverhalten bei $\lambda = 220 \text{ nm}$ analysiert. Nach Optimierung des Gradienten und der Laufzeiten erfolgte die Reaktionskontrolle nach der in Tabelle 4.7 angegebenen Methode.

Für die Analyse und Auswertung der Spektren wurde die Software ChromQuest Version 5.0 (Thermo Scientific, Waltham, USA) verwendet.

Tabelle 4.6: Laufmittelgemische für die RP-HPLC

Eluent A	Eluent B
95 % ACN	95 % MPW
5 % MPW	5 % ACN
0,1 % TFA	0,1 % TFA

Tabelle 4.7: RP-HPLC-Methoden

Methode	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]
1. Präparative HPLC	0	0	100	7,5
	5	0	100	7,5
	100	100	0	7,5
	105	0	100	7,5
	110	0	100	7,5
2. Analytische HPLC	0	0	100	1
	5	100	0	1
	6	0	100	1
	6,5	0	100	1
3. Sortase-Reaktionskontrolle	0	0	100	1
	6	20	80	1
	9	20	80	1
	12	100	0	1
	13	0	100	1
	13,5	0	100	1

4.3.11. Massenspektrometrische Analysen

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein Verfahren zur Charakterisierung von chemischen Verbindungen durch Analyse ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z). Dabei wird das zu analysierende Molekül durch verschiedene Methoden ionisiert, die Ionen durch ein elektrisches Feld unter Vakuum beschleunigt und ihr Masse-zu-Ladungs-Verhältnis bestimmt.

4.3.11.1. MALDI-ToF-MS-Analysen von Proteinen und Peptiden

Bei dem Verfahren der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalysator, kurz MALDI-ToF (*matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-time of flight*), wird der Analyt mit niedermolekularen Matrices kokristallisiert und anschließend per Laserbeschuss ionisiert. Die entstehenden Ionen werden durch ein elektromagnetisches Feld im Flugzeitanalysator beschleunigt und treffen nach einer Flugphase im Vakuum auf den Ionendetektor, wobei kleine und leichtere Ionen diesen schneller erreichen. Durch Messung der Flugzeit (ToF, *time of flight*) kann mit einem Masse-zur-Flugzeit-Verhältnis die Molekularmasse des Analyten berechnet werden. Der Vorteil dieser Messmethode besteht darin, dass ein großer Massebereich analysiert werden kann und sich somit für Peptide und auch Proteine mit hoher m/z eignet.

Zur Analyse von Peptiden und Proteinen wurde in dieser Arbeit eine ZipTip aufgereinigte Probe mit einer 2,5-Dihydroxybenzoesäure- (DHB) oder Sinapinsäure-Matrix auf den MALDI-Träger kokristallisiert und an einer Voyager-DE Biospectrometry Workstation mit einem LSI-Stickstofflaser ($\lambda = 337$ nm, Pulsbreite 3 ns, 3 Hz Wiederholungsrate) vermessen. Dabei betrug die Beschleunigungsrate 25 kV. Die Spektren wurden mit der Voyager Control Software aufgenommen und über 50 einzelne Scans akkumuliert. Zur Kalibrierung der Messungen von großen Proteinen wurde eine Proteinmischung als Kalibrierstandard verwendet, bestehend aus Rinderinsulin (5735 Da), Thioredoxin aus *E. coli* (11674 Da) und Pferdeapomyoglobin (16952 Da). In diesem hohen Massenbereich liegt der Fehler bei +/- 0,01 – 0,1 %.

4.3.11.2. ESI-MS Bestimmung von Peptiden

Zur Bestimmung der Feinmasse von Peptiden wurden diese in der Abteilung Massenspektrometrie (Universität Bielefeld, Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Gröger) durch Herrn Dr. Jens Sproß mit dem ESI-Massenspektrometer Esquire 3000 Iontrap (Bruker Daltonik) analysiert. Dieses Gerät ionisiert die Probe schonend mittels Elektrospray (ESI, *electrospray ionisation*) und eignet sich zur Analytik von Peptiden und Proteinen, die mit anderen Ionisierungsmethoden wie die chemische Ionisierung fragmentiert werden würden. Der Analyt wird bei dieser Methode in einem geeigneten Lösemittel durch eine Kapillare versprüht, an deren Spitze eine hohe Spannung angelegt ist. Durch das elektrische Feld bildet sich ein kleiner, etwa 10 µm großer Aerosoltropfen (Taylor-Kegel), welcher durch das Trägergas Stickstoff vernebelt und das Lösemittel verdampft wird, bis sich schließlich freie Analytionen bilden. Wird an der Kapillarenspitze eine positive Spannung angelegt, erzeugt man positive Ionen (positiv Modus), negativ analog, so das ionisierte Moleküle als $[M+H]^+$ oder als $[M-H]^-$ auftreten. Die Trennung der Ionen erfolgt mit Hilfe einer Ionenfalle. Die Peptidprobe wurde in Acetonitril gelöst und über eine Spritzenpumpe in das Gerät appliziert. Die Spektren wurden mit der Bruker Daltonik esquireNT Control Software aufgenommen.

4.3.11.3. LC-MS-Analyse von Peptidgemischen

Zur Identifizierung von Peptiden in Gemischen, wie bei der Analyse von Sortase A-Transpeptidierungsreaktionen, wurden die Reaktionsansätze mittels LC-MS (*liquid chromatography-mass spectrometry*) untersucht. Hierbei wird eine RP-HPLC (vgl. 4.3.10) zur Auftrennung der Gemische und anschließender massenspektrometrischer Analyse zur Identifikation der Bestandteile angewandt. Die Kopplung der beiden Methoden liefert für jeden Peak im Chromatogramm ein separates Massenspektrum. In dieser Arbeit wurde dazu als RP-HPLC-Einheit das Alliance HAT (Waters) und gekoppelt ein ZQ 2000 Massenspektrometer (Waters) mit ESI Ionisierung eingesetzt. Die Trennung erfolgte über RP-HPLC mit Hilfe einer RP18 Säule und mit einem ACN/H₂O Laufmittelgemisch (siehe Tabelle 4.6). Die verwendeten Laufzeiten und die Gradienten der Laufmittel sind in Tabelle 4.8 aufgelistet. Es wurde jeweils eine 25 µl Probe des jeweiligen Reaktionsansatzes appliziert. Die Analyse der Chromatogramme und Massenspektren erfolgte mit der Analytik Software MestreNova.

Tabelle 4.8: Parameter der RP-HPLC mit MS-Kopplung

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]
0	5	95	0,4
10	95	5	0,4
25	5	95	0,4

4.3.11.4. Peptide mass fingerprinting mittels MALDI-ToF-MS

Peptide mass fingerprinting (PMF) ist eine Technik zur Analyse zur Identifizierung von Proteinen. Hierfür werden zu analysierenden Proteinen in kleine Fragmente durch die Protease Trypsin gespalten. Diese Peptidfragmente werden per MALDI-ToF-MS vermessen. Die erhaltenen Massen der Fragmente werden anschließend mit den Molekulargewichten der *in silico* geschnittenen Fragmente der Proteine verglichen. Die Untersuchung von Protein-Fragmenten, die zuvor durch tryptischen In-Gel-Verdau präpariert wurden, erfolgte mit einem MALDI-ToF/ToF Massenspektrometer Ultraflex extreme der Firma Bruker Daltonik (Bremen). Die Proteinproben (1 µl) wurden mit DHB-Matrix (1 µl) auf dem MALDI-Träger kokristallisiert, per MALDI ionisiert und über *time of flight* (ToF) analysiert. Die erhaltenden Peaks der Massenspektren wurden mit der Software mMass konvertiert und die Daten mit den zu erwarteten Massen der Peptidfragmente verglichen. ^[113] Dadurch können analysierte Protein identifiziert werden. Ferner können die detektierten Massen online über eine „*Mascot Peptide Mass Fingerprint*“ Suche mit einer Datenbank abgeglichen werden. ^[114] Dabei basierte die verwendete Datenbank auf genomische Daten der NCBI *protein database*.

4.4. Circular dichroismus (CD)

Mit der Methode der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) können mit geringen Protein- oder Peptid-Konzentrationen Informationen zur Sekundärstruktur generiert werden. Der Einsatz von geringen Mengen in wässrigen Lösungen ist ein Vorteil gegenüber anderer Methoden, wie der Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie, bei denen mehrere Milligramm an Protein benötigt werden und das die Proteine kristallisierbar sein müssen. Die Strukturaussagen der CD-Spektren sind im Vergleich zu NMR- oder Röntgenstruktur-Daten weniger exakt, aber ausreichend um eine Aussage über eine korrekte Faltung zu machen und Konformationen zu vergleichen. Des Weiteren können durch CD-Messungen der Gehalt an Sekundärstrukturelementen berechnet und die Stabilität unter Temperatureinfluss bestimmt werden. Bei der chiroptischen Methode der CD-Spektroskopie wird die Absorption circular polarisierten Lichts durch optisch aktive Substanzen gemessen. Hierbei wird Licht durch elektrooptische Modulatoren linear polarisiert, so dass eine links- und rechtsgängige circular polarisierte Welle gleicher Amplitude und Phase entsteht. ^[115] Trifft dieses linearisierte Licht auf eine optisch aktive Substanz, werden die beiden Wellen unterschiedlich stark absorbiert. Dabei weisen die elektrischen Feldvektoren beider Wellen nach dem Durchtritt der Probe unterschiedliche Längen auf. Die Überlagerung der beiden Wellen resultiert in einer elliptischen Trajektorie, deren Maß als Elliptizität bezeichnet wird. Die Elliptizität zeigt an, in welchem Ausmaß die optisch aktive Probe das circular polarisierte Licht in elliptisch polarisiertes Licht umwandelt. Berechnet wird die Elliptizität θ dabei durch den Arcustangens des Verhältnisses von großer zu kleiner Halbachse der Ellipse (Abbildung 4.6). ^[115]

$$\theta = \arctan \left(\frac{b}{a} \right) \quad (4-3)$$

In modernen Messgeräten wird die Differenz der Absorption ΔA der circular polarisierten Lichtstrahlen direkt gemessen. Trotzdem wird weiterhin in die Elliptizität umgewandelt, die sich wie folgt berechnen lässt: ^[116]

$$\theta = 32980 * \Delta A \quad (4-4)$$

Um verschiedene Substanzen vergleichen zu können, wird eine auf die auf die Stoffmenge bezogene Elliptizität $[\theta]$ verwendet: ^[116]

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 * c * l} [deg * cm^2 * dmol^{-1}] \quad (4-5)$$

Dabei ist c die Konzentration des Analyten und l die Länge der Messzelle.

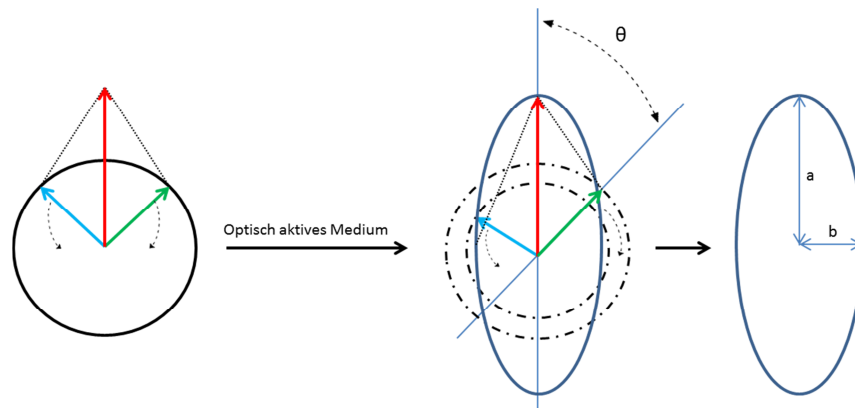


Abbildung 4.6: Entstehung der Elliptizität bei der CD-Spektroskopie

Das Prinzip von CD-Spektroskopie beruht auf der unterschiedlichen Absorption links (blau) und rechts (grün) circular polarisierten Lichtes durch optisch aktive Substanzen. Nach Durchtritt resultieren die unterschiedlich stark absorbierten Wellen in einer elliptischen Trajektorie, deren Neigung aus der optischen Drehung resultiert. Die Elliptizität θ entspricht dabei dem Arcustangens aus b/a .^[115]

Bei der Analyse von Proteinsekundärstrukturanteilen wird auch die Anzahl an Amidbindungen, bzw. die Anzahl an Aminosäuren mit folgender Formel berücksichtigt:^[116]

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 * c * l * N} [\text{deg} * \text{cm}^2 * \text{dmol}^{-1}] \quad (4-6)$$

Hier wird die molare Elliptizität pro Aminosäure mit N als Anzahl an Aminosäuren berechnet.

Zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteilen von Proteinen wird im kurzwelligen ultravioletten Bereich von 190 - 250 nm gemessen, in dem die Amid-Bindung angeregt werden. Durch einen $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang absorbieren die π -Elektronen der Carbonylgruppe mit hoher Intensität bei 190 nm. Geringere Intensität weist der Übergang von $n \rightarrow \pi^*$ bei 210 - 220 nm durch nicht bindende Elektronen des Carbonylsauerstoffes auf. Jedes Sekundärstrukturelement weist ein charakteristisches Spektrum auf, da die Intensitäten der Übergänge von den jeweiligen Torsionswinkeln der Aminosäuren abhängen (vgl. Abbildung 4.7).^[117] Diesbezüglich zeigt ein reines β -Faltblatt Spektrum ein Maximum bei 196 nm und ein Minimum bei 218 nm. Im Gegensatz dazu führt die Messung einer α -Helix zu einem Minimum bei 222 nm ($n \rightarrow \pi^*$ Übergang), einem Minimum bei 208 nm und einem ausgeprägten Maximum bei 190 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang).^[117,118] Ferner absorbieren aromatische Seitenketten und Disulfidbrücken im langwelligen ultravioletten Bereich von 240- 350 nm und geben Auskunft zur Tertiärstruktur.

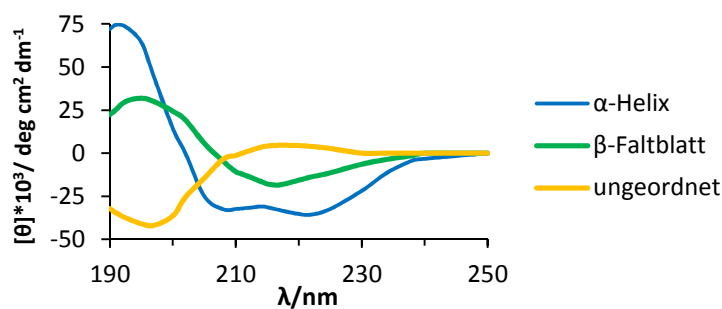


Abbildung 4.7: CD-Spektren isolierter Sekundärstrukturen

Kurvenverläufe idealisierter Proteine mit einheitlicher Sekundärstruktur. ^[119]

Da Proteine eine Mischung aus verschiedenen Sekundärstrukturelementen enthalten, ist das generierte Spektrum eine Summe aus den einzelnen Sekundärstrukturen. Unter Verwendung von Algorithmen und Referenzspektren ^[120] können die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente an der Gesamttopologie berechnet werden. ^[119–121] Dabei muss ein Fehler von ca. +/- 5 % der errechneten Sekundärstrukturelemente angesetzt werden. Ferner kann durch CD-Messungen bei sich erhöhenden Temperaturen die Entfaltung durch Verlust der Sekundärstruktur eines Proteins beobachtet werden und daraus die Denaturierungstemperatur bestimmt werden. ^[122] Nicht nur Proteine und Peptide, sondern auch Oligonukleotid-Strukturen können mittels CD-Spektroskopie analysiert werden. Dabei zeigt DNA in B-Konformation ein ausgeprägtes Maximum bei ca. 275 nm, welches durch die Wechselwirkung der Basenpaare (*base stacking*) untereinander erzeugt wird, und ein Minimum bei ca. 245 nm mit gleicher Amplitude. Dieses Minimum wird durch die rechtsgängige Helix der B-DNA verursacht. A-DNA hingegen ist durch ein im Vergleich zur B-DNA wesentlich ausgeprägterem Maximum bei 270 nm und einem Minimum bei etwa 210 nm charakterisiert. Die exakte Lage der Maxima und Minima ist dabei von der jeweiligen Basenzusammensetzung abhängig. ^[117,118,123]

4.4.1. Bestimmung der Sekundärstrukturanteile von Proteinen

In dieser Arbeit wurden die CD-Spektren mit einem J-810 CD-Spektrometer (JASCO) bei 20 °C aufgenommen. Dabei wurde jedes Spektrum als Mittelwert aus drei Messungen berechnet. Die Scangeschwindigkeit betrug 50 nm/min, wobei alle 0,1 nm ein Datenpunkt aufgenommen wurde. Für alle CD-Messungen wurde eine 0,1 mm Quarzküvette (Hellma Analytics) verwendet. Die Messungen wurden in CD-Phosphatpuffer (3.11.4) aufgenommen und eine Basislinie des verwendeten Puffers vom jeweiligen Spektrum abgezogen.

Zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile wurden die Proteine in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 350 - 190$ nm vermessen. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen

betragen 20 μM . Alle Spektren wurden anhand von Gleichung (4-6) in die molare Elliptizität pro Aminosäure umgerechnet. Die Dekonvolution der Spektren und die Berechnung der Anteile der Sekundärstrukturelemente nach Chen und Yang wurden mit dem Programm Jasco Spectra Manager durchgeführt. [120]

4.4.2. Analyse der Protein-DNA-Komplexbildung mittels CD

Um die Interaktion zwischen Proteinen und DNA zu untersuchen, wurden die Spektren der einzelnen PhoB^{DBD}-Proteine und des Komplexes mit der DNA in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen aufgenommen. Dabei wurden die gleichen Parameter wie zur Vermessung der Proteinlösungen angewandt. Die Ausgangskonzentration der DNA betrug 6 - 15 μM und wurde mit CD-Phosphatpuffer und Proteinlösung auf die Verhältnisse von 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3 DNA zu Protein eingestellt. Die Bindung von PhoB^{DBD}-Proteinen an spezifische DNA-Sequenzen resultiert in einer Beugung der DNA, welche mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht werden kann. [20] Dazu wurden die entsprechenden Protein-Spektren mit gleicher Konzentration von den Komplex-Spektren abgezogen. Die molare Absorption ($\Delta\varepsilon$) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\Delta\varepsilon = \frac{\theta}{32980 * c * l} \quad (4-7)$$

Dabei ist θ die Elliptizität in mdeg, c die Endkonzentration der DNA in mol/l und l die Länge der Messzelle in cm.

4.4.3. Bestimmung der thermischen Stabilität von Proteinen durch temperaturabhängige CD-Messungen

Mit Hilfe von temperaturabhängigen CD-Messungen lässt sich die thermische Stabilität von Proteinen untersuchen. Die eingesetzten Proteinlösungen hatten eine Konzentration von 20 μM und wurden mit einem Temperaturgradient von 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von 20 - 90 $^{\circ}\text{C}$ in einem Scanbereich von $\lambda = 280 - 190 \text{ nm}$ vermessen. Die Scangeschwindigkeit betrug 50 nm/min. Dabei wurde alle 3 $^{\circ}\text{C}$ ein neues Spektrum aufgezeichnet. Die molare Elliptizität pro Aminosäure wurde mit Gleichung (4-6) berechnet. Die Auswertung erfolgte durch Auftragung der molaren Elliptizität (220 nm) gegen die Temperatur und die Bestimmung der Denaturierungstemperatur durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Programms GraphPad Prism. Des Weiteren wurde eine 3-dimensionale Darstellung mithilfe von Origin erstellt.

4.5. Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Die Oberflächenplasmonresonanz (SPR, *surface plasmon resonance*) ist eine Schlüsseltechnologie zur Interaktionsanalyse von Biomolekülen und ermöglicht die Analyse von unmarkierten Interaktionspartnern mit hoher Sensitivität und in Echtzeit. Dabei werden Messgeräte eingesetzt, die das physikalische Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz ausnutzen, um Interaktionen auf der Oberfläche eines Sensorchips zu detektieren. Einer der interagierenden Partner wird als Ligand auf dem Sensorchip immobilisiert. Der zweite interagierende Partner wird durch ein Flusszellensystem als gelöster Analyt über die Chipoberfläche geleitet und kann dort an den Liganden binden. ^[124]

Das generelle Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz beruht auf der totalen inneren Reflexion von Licht (TIR, *total internal reflection*) (siehe Abbildung 4.8). Diese tritt auf, wenn sich ein polarisierter Lichtstrahl in einem Medium mit hohem Brechungsindex (Prisma) ausbreitet und unter einem bestimmten Winkel (θ) auf ein Medium mit niedrigeren Brechungsindex (n_2) trifft. Trotz der totalen Reflexion an dieser Grenzschicht dringt ein kleiner Teil der Energie in das Medium mit dem geringeren Brechungsindex in Form einer evaneszenten, exponentiell abklingenden Welle (E) ein. Die Grenzschicht ist mit einem dünnem Goldfilm beschichtet, an dessen Oberfläche freie Elektronen oszillieren (Kretschmann Konfiguration). ^[125] Die Quantelung dieser Oszillation wird als Oberflächenplasmon bezeichnet. Unter einem bestimmten Einfallswinkel des Lichtes, dem Resonanzwinkel θ , koppeln die Photonen des polarisierten Lichtstrahles mit den Plasmonen der Goldoberfläche, wenn die beiden Wellenvektoren k_x und k_{sp} identisch sind. Die Kopplung der beiden Quasipartikel führt zu einer Verstärkung der Amplitude der evaneszenten Welle (E). ^[126,127] Das Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz kann durch einen Energieverlust des reflektierten Lichtes beim Resonanzwinkel detektiert werden, was in einer signifikanten Reduktion der Intensität des reflektierten Lichtes resultiert. ^[126]

Zur Messung von Interaktionen werden Sensorchips verwendet, deren Glasoberfläche mit einem 50 nm dünnen Goldfilm beschichtet sind. Diese Goldschicht ist mit einer Carboxymethyldextran-Matrix beschichtet. Wenn eine DNA an den Chip immobilisiert werden soll, kann dies durch Streptavidin-Biotin-Interaktion realisiert werden. Dabei wird an die Carboxy-funktionalisierte Matrix Streptavidin gekuppelt. Anschließend kann biotinylierte DNA zur Immobilisierung verwendet werden.

Ein mit der DNA interagierendes Protein wird als gelöster Analyt durch eine Mikroflusszelle über die Chipoberfläche geleitet und kann dort an die DNA binden. ^[124] Durch die Bindung innerhalb der evaneszenten Welle wird der Brechungsindex nahe der Chipoberfläche verändert, was in einer Änderung der Intensität des reflektierten Lichtstrahls beim

Resonanzwinkel resultiert. Da die Änderung des Brechungsindex einer Massenänderung gleichzusetzen ist, können die verschiedenen Stadien einer Interaktion, wie die Assoziation, der Gleichgewichtszustand und die Dissoziation, in Echtzeit gemessen und Daten zur Spezifität und Affinität extrahiert werden. [124]

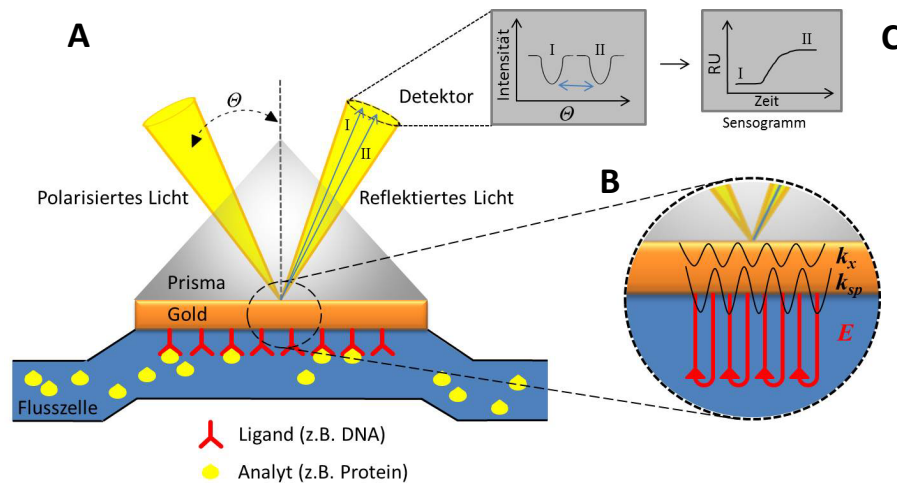


Abbildung 4.8: Aufbau zur Messung der Oberflächenplasmonresonanz

A Aufbau eines SPR-Messsystems, bestehend aus Lichtquelle, Detektor, Prisma, Sensorchip mit Goldoberfläche und Flusszelle. Der an der Goldoberfläche gebundene Ligand interagiert mit dem durch die Flusszelle geleiteten Analyten. **B** Die Photonen eines polarisierten Lichtstrahles koppeln am Resonanzwinkel Θ mit den Plasmonen der Goldoberfläche, wenn die Wellenvektoren k_x und k_{sp} identisch sind und verstärken die Amplitude der evaneszenten Welle (E). Dies führt zu einer Verringerung der Intensität des reflektierten Lichtstrahls am Resonanzwinkel Θ . **C** Durch Bindung eines Analyten an den immobilisierten Liganden ändert sich der Brechungsindex nahe der Chipoberfläche und resultiert in einem veränderten Resonanzwinkel (Θ I und Θ II). Die Änderung des Resonanzsignals wird in RU gemessen und in Abhängigkeit von der Zeit in einem Sensogramm aufgezeichnet.

Die Änderung des Brechungsindex, welche proportional zur Massenänderung an der Goldoberfläche ist, wird in Resonanzeinheiten, RU (*resonance units*), angegeben. Die Änderung um 1 RU entspricht dabei einer Massenänderung von 1 pg/mm^2 . [124]

Bei Bindung der Interaktionspartner werden vier charakteristische Phasen eines SPR-Sensogramms deutlich (Abbildung 4.9). Wenn eine stabile Basislinie der RU durch Puffer erreicht ist, wird der Analyt injiziert. Dies führt zur Bindung des Analyten an den Liganden und dadurch zu einem Anstieg der gemessenen RU im Verlauf der Assoziationsphase, bis sich ein Gleichgewicht aus Assoziation und Dissoziation einstellt. Nach Ende der Injektion der Probe löst der Pufferstrom die gebundenen Analyten und es erfolgt die Dissoziationsphase. Durch eine Regeneration mittels pH-Änderung oder Detergenzien werden alle Analyten entfernt und es erfolgt eine Wiederherstellung des Ausgangsniveaus der Resonanzeinheiten. [128]

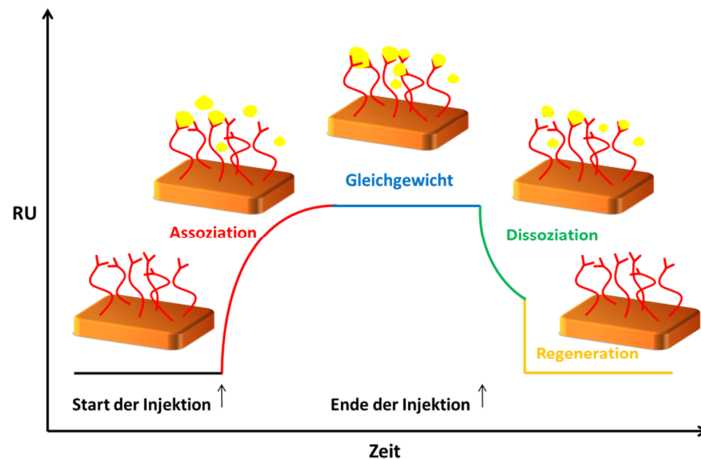


Abbildung 4.9: Vier Phasen des SPR-Sensogramms

Nach der Injektion des Analyten bindet dieser an den Liganden und der RU-Wert steigt in der Assoziationsphase an. Es bildet sich ein Gleichgewicht aus, in dem die Anzahl der Analyten, die dissoziieren, der Anzahl derer, die binden entspricht. Nach Beendigung der Injektion des Analyten dissoziieren diese von dem Liganden in der Dissoziationsphase. Um nach einer Messung den Analyten vollständig zu entfernen, wird in einer Regenerationsphase mit Detergenzien gespült und so der RU-Wert auf das Ausgangsniveau gebracht.

Bei dem hier verwendeten System von Biacore (Biacore 3000, GE Healthcare) werden Sensorchips mit vier Flusszellen (FC, *flow channel*) verwendet. Dementsprechend können drei verschiedene Liganden parallel vermessen werden, während eine FC als Referenzzelle ohne aktiven Liganden dient. So können eventuelle Puffersprünge und unspezifische Bindungen des Analyten durch Subtraktion der Referenzzelle von der Messzelle herausgerechnet werden.

4.5.1. Immobilisierung des DNA-Liganden

Zur Interaktionsanalyse zwischen Protein-DNA-Komplexen mittels SPR wurde die zu untersuchende DNA als Ligand auf der Chipoberfläche immobilisiert und das bindende Protein als Analyt in Laufpuffer gelöst über die Oberfläche geleitet. Die Immobilisierung erfolgte mit einem SA-Sensorchip über Streptavidin-Biotin-Interaktionen, wobei der Sensorchip eine Streptavidin-Oberfläche aufweist und die DNA als Ligand am 5'-Ende biotinyliert ist. Die analysierten DNA-Oligonukleotide sind in Kapitel 3.9 aufgeführt. Zur Immobilisierung wurde ein Natriumphosphatpuffer (3.11.5) mit einer Flussgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet. Zur Vorbereitung des Chips wurden alle vier FCs mit einer Natriumhydroxid-Natriumchlorid-Lösung (3x 20 μl , 50 mM NaOH, 1 M NaCl, in Laufpuffer) und einer niedrig konzentrierten Detergenz-Lösung (2x 20 μl , 0,05 % SDS in Laufpuffer)

äquibriert. Zur Äquilibration des Chips wurde dreimal mit Laufpuffer bis zu einer stabilen Basislinie gewaschen (*prime*). Die Immobilisierung der DNA erfolgte manuell und einzeln für jede Flusszelle. Die jeweilige DNA-Lösung (20 nM) wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 µl/min appliziert, bis eine Steigerung der RU von circa 400 erreicht wurde.^[99] Diese Ligandenbeladung entspricht nach folgender Gleichung einer zu erwarteten Maximalantwort von ~ 600 RU bei einer molaren Masse des Liganden von ~ 15500 g/mol und des Analyten von ~ 12000 g/mol und einer voraussichtlichen Bindungsstöchiometrie von 2:1.^[127]

$$RU_{max} = RU_{Beladungsgrad} * \frac{MW_{Analyt}}{MW_{Ligand}} * \text{Bindungsstöchiometrie} \quad (4-8)$$

Danach folgte eine Regeneration mit der SDS-Regenerationslösung (0,05 % SDS in Laufpuffer) und anschließend eine 30 minütige Pufferspülung zur Stabilisierung der RU-Werte.

4.5.2. SPR-Messung der Protein-DNA-Interaktion

Um die Affinität der Protein-DNA-Interaktion zu analysieren wurden Protein-Verdünnungsreihen in Laufpuffer hergestellt. Dabei war zu beachten, dass die Protein-Lösung gegen die gleiche Charge des Laufpuffers dialysiert wird, die auch im Bindungsexperiment verwendet wird, um Puffersprünge und eine instabile Basislinie zu vermeiden. Die Messungen erfolgten automatisiert mit der Biacore Control Software, mit dem die Messzyklen von verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,1 – 40 µM des Proteins in Doppelbestimmung durchgeführt werden können. Dabei wurden alle vier FCs parallel behandelt. Der Messzyklus begann mit einer drei minütigen Äquilibration der FCs mit Laufpuffer (30 µl/min). Anschließend wurden 60 µl der jeweiligen Proteinprobe innerhalb von zwei Minuten injiziert. Die Dissoziation des Proteins erfolgte mit Laufpuffer für 5 min. Abschließend wurde zur Regeneration zweimal mit 15 µl Regenerationslösung (0,05 % SDS in Laufpuffer) appliziert und zur Stabilisierung der Basislinie für weitere fünf Minuten mit Laufpuffer gewaschen. Dieser Messzyklus wurde anschließend für die weiteren Konzentrationen der Proteine wiederholt. Während der Messzyklen wurden parallel die RU-Werte aller Flusszellen erfasst und durch Subtraktion der Referenzzelle von der Messzelle die Differenzsensogramme der jeweiligen Interaktion erstellt.

4.5.3. Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D

Die Ergebnisse der SPR-Messungen wurden quantitativ durch Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_D) evaluiert. Dabei bezeichnet der K_D -Wert die Konzentration an Analyt, bei dem die Hälfte der Ligandenmoleküle mit dem Analyten gesättigt ist. Über den K_D kann die Affinität der einzelnen Proteine miteinander verglichen werden. Dabei bedeutet ein kleinerer Wert eine größere Ligand-Rezeptor-Affinität.

Als Analyten wurden die zu untersuchenden PhoB^{DBD}-Proteine und als Liganden zwei unterschiedliche die DNA-Oligonukleotide eingesetzt. Diese weisen im Fall der **MmMm**-DNA zwei und im Fall der **MmXx**-DNA eine komplette Bindestelle, jeweils bestehend aus dem TGTCA-Motiv der großen Furche (**M** = *Major groove*) und der A/T-reichen Sequenz der kleinen Furche (**m** = *minor groove*), für das PhoB^{DBD}-Protein auf (DNA-Sequenzen vgl. Tabelle 3.5). Zur Berechnung des K_D -Wertes wurde zuerst eine Sättigungskurve der RU im Gleichgewicht (RU_{eq}) gegen die Konzentration des PhoB^{DBD}-Proteins erstellt und durch nichtlineare Regression unter Verwendung eines adäquaten Bindungsmodells der K_D -Wert anschließend extrahiert.^[129] Obwohl die vermessene MmMm-DNA zwei Bindestellen besitzt, führten Berechnungen nach einem 1:2 Bindemodell nicht zu verlässlichen Daten. Erfolgreiche Berechnungen der K_D -Werte von Messungen der PhoB^{DBD}-Proteine mit der MmMm-DNA erfolgten mit einem 1:1 Bindemodell unter Berücksichtigung einer möglichen kooperativen Bindung. Die Verwendung des Hill-Koeffizienten dient dem Nachweis einer Kooperativität der beteiligten Bindestellen. Er bezieht sich auf die Steigung der sigmoidalen Kurve, bei Auftragung von RU_{eq} gegen die logarithmierte Konzentration der PhoB^{DBD}-Proteine. Nach folgender Formel wurden die K_D -Werte und Hill-Koeffizienten der Messung der MmMm-DNA mit den PhoB^{DBD}-Proteinen durch nicht-lineare Regression bestimmt:

$$RU_{eq} = \frac{R_{max} * [PhoB^{DBD}]^h}{K_D^h + [PhoB^{DBD}]^h} \quad (4-9)$$

Ein Hill-Koeffizient von $h = 1$ steht für eine unabhängige Besetzung zweier Bindestellen. Bei $h < 1$ liegt eine negative, bei $h > 1$ eine positive Kooperativität vor. Der maximal erreichbare Wert bei zwei zu besetzenden Bindestellen liegt bei 2,0. Wird dieser Wert erreicht, weisen die beiden Bindestellen eine absolute positive Kooperativität auf.^[130]

Die BIAevaluation Software eignet sich für eine Gleichgewichtsanalyse der gemessenen kinetischen Daten, aufgrund derer die Assoziations- und Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten (k_{on}/k_{off}) bestimmt werden können.^[131] Dabei verwendet die Software kinetische Modelle, die eine direkte numerische Integration der Sensogramme durchführt. Mit verschiedenen Bindungsmodellen wird eine nichtlineare Regression durchgeführt und

berechnete SPR-Kurven erstellt, welche mit den gemessenen Daten verglichen werden. Die bei der Bindung von PhoB^{DBD} an die *pho box*-DNA gemessenen Sensogramme eigneten sich nicht für eine solche Auswertung. Durch eine geringe Übereinstimmung der gemessenen und der berechneten Kurven konnten keine verlässlichen Ergebnisse generiert werden. Die Bereiche der Assoziation und Dissoziation konnten durch keines der verwendeten Bindungsmodelle abgedeckt werden. Die Gründe dafür liegen in der sehr schnellen Assoziation und Dissoziation der PhoB^{DBD}-Proteine, die zu dem beobachteten starken Anstieg und Abfall der RU-Signale führen (vgl. Abbildung 5.12). Diese werden von der Analyse-Software teilweise als Puffersprünge gewertet und können dadurch nicht analysiert werden. Des Weiteren war insbesondere die schnelle Assoziation der Messung der PhoB^{DBD}-Proteine mit der MmMm-DNA problematisch, da hier mit einem 1:2 Modell zwischen K_{D1} und K_{D2} für zwei Bindestellen nicht differenziert werden konnte. Aus diesen Gründen wurden die gemessenen SPR-Sensogramme nicht mittels BIAevaluation Software, sondern durch Berechnung der K_D -Werte wie oben beschrieben nach einem 1:1 Bindemodell ausgewertet.

Die zweite analysierte MmXx-DNA weist nur eine Bindestelle auf, daher wurden die K_D -Werte der Messungen von PhoB^{DBD}-Proteinen mit der MmXx-DNA, welche nur eine Bindestelle besitzt, mit einem 1:1-Bindemodell nach folgender Formel berechnet:

$$RU_{eq} = \frac{RU_{max} * [PhoB^{DBD}]}{K_D + [PhoB^{DBD}]} \quad (4-10)$$

4.6. Peptid- und Protein-Modifizierung mit Hilfe der Sortase A (SML)

4.6.1. Sortase A-Testreaktionen mit Peptiden

Die Sortase A-vermittelte Transpeptidierung wurde durch Testreaktionen mit kurzen Peptiden und einem HPLC-basierten Assay etabliert. Hierzu wurden das LPETG-Peptid (**2**) mit der Sortase A-Erkennungsequenz und das G₂HF-Peptid (**1**) als Glycin-Nukleophil mit Hilfe der SPPS (4.3.9) dargestellt und als 1 mM Stammlösungen in BS-Puffer (3.11.6) angesetzt. In Optimierungsversuchen wurden die Konzentrationen des Enzyms (SrtA_{Δ59}; 10/ 30/ 60 μM), der Peptide (100/ 300/ 600 μM) sowie deren Verhältnisse zueinander variiert. Die beschriebenen Reaktionsansätze sind mit den jeweiligen Konzentrationen und molaren Verhältnissen an Sortase A und der Peptide in Tabelle 4.9 zusammengefasst. Als Kontrollen dienten Ansätze einerseits ohne Sortase A, andererseits ohne eines der beiden Peptide. Die Reaktionen erfolgten bei 37 °C unter leichtem Schütteln und variierenden Inkubationszeiten von 0 – 48 h in BS-Puffer, dem 5 μM CaCl₂ zugesetzt wurde. Durch Zusatz von EDTA (Endkonz. 7,5 mM) wurden die Reaktionen vor der Analyse gestoppt. Die Reaktionskontrollen erfolgten jeweils durch analytische RP-HPLC- (4.3.10), MALDI-ToF-MS- (4.3.11.1) und LC-MS-Analysen (4.3.11.3).

Tabelle 4.9: Konzentrationen und molare Verhältnisse der SML-Testreaktionen

Reaktionsansatz	SrtA _{Δ59} [μM]	G ₂ HF-Peptid (1) [μM]	LPETG-Peptid (2) [μM]	Molare Verhältnisse SrtA _{Δ59} /(1)/(2)
a	10	100	100	0,1/1/1
b	-	-	100	-
c	-	100	-	-
d	30	300	300	0,1/1/1
e	30	-	300	0,1/0/1
f	30	300	300	0,1/1/1
g	60	300	300	0,2/1/1
h	30	600	300	0,1/2/1
i	30	300	300	0,1/1/2

Die Quantifizierung der Produktumsätze erfolgte durch Evaluierung der RP-HPLC Daten. Dabei wurden die Peakflächen der einzelnen Peptide mit Hilfe der Software OriginPro 9.1G integriert. Zur Berechnung der Produktumsätze wurde eine Standardgerade der injizierten Stoffmenge im Verhältnis zur Peakfläche des reinen G₂HF-Peptids (**1**) erstellt. Mittels der daraus bestimmten Geradengleichung konnte die Abnahme des G₂HF-Signals (**1**) nach erfolgter Sortase-Reaktion berechnet werden.

4.6.2. Sortase A-vermittelte Cyclisierung von Proteinen

Die Cyclisierung von Proteinen erfolgte durch die Sortase A-vermittelte Transpeptidierung. Hierfür wurde eine PhoB^{DBD}-Mutante mit Sortase A-Erkennungssequenz (LPSTG) hergestellt. Für die Cyclisierung wurde das PhoB^{DBD}-Protein mit dem Enzym SrtA_{Δ59} in den angegebenen Konzentrationen in BS-Puffer (3.11.6) mit 5 μM CaCl₂ bei 37 °C für 4 bzw. 24 h inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 4.10 aufgelistet. Die Analyse der Reaktionen erfolgte per MALDI-ToF-MS (4.3.11.1), SDS-PAGE (4.3.4) und PMF (4.3.11.4).

Tabelle 4.10: Reaktionsansätze zur Sortase A-vermittelten Cyclisierung von MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG

Reaktionsansatz	SrtA _{Δ59} [μM]	MG ₂ A_PhoB ^{DBD} _LPSTG [μM]	Inkubationszeit [h]	Molares Verhältnis SrtA _{Δ59} /Protein
j	40	40	4	1/1
k	40	-	4	-
l	-	40	4	-
m	20	40	4	1/2
n	40		4	1/2
o	-	40	4	-
p	40	40	24	1/1
q	12	24	4	1/2

4.6.3. Immobilisierung von Sortase A an Chitin-Beads

Eine Sortase A-Mutante für eine Immobilisierung an Chitin-Beads wurde durch Klonierung der Sortase A-Sequenz in den pTWIN2-Vektor von Christian Bartz im Rahmen seiner Bachelorarbeit generiert.^[112] Die Mutante SrtA_{Δ59}-CBD besitzt eine C-terminale Chitin-Bindedomäne (CBD), über welche das rekombinante Protein an Chitin-Beads (NEB, Frankfurt a. M.) gebunden werden kann. Zur Immobilisierung wurde eine Chromatographiesäule (GE Healthcare) mit 2,5 ml Chitin-Beads beladen und die Säule mit dem

zehnfachen Säulenvolumen (50 ml, 1 ml/min) an B2-Waschpuffer (3.11.6) unter Verwendung einer Spritzenpumpe (KD Scientific) äquilibriert. Das Enzym wurde als 20 ml filtrierter Überstand der Zellyse (4.3.1) mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde die Affinitätssäule zur Entfernung von Verunreinigungen mit B2-Puffer (25 ml, 1 ml/min) und BS-Puffer (50 ml, 1 ml/min) gewaschen. Zur Überprüfung der Beladung wurden die Beads per SDS-PAGE (4.3.4) analysiert. Dazu wurde eine geringe Menge der Beads mit 40 µl BS-Puffer und 20 µl SDS-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt, 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert und 10 µl des Überstandes auf ein SDS-Gel aufgetragen.

4.6.4. Ligation von Peptiden und Proteinen mittels immobilisierter Sortase A

Die Reaktivität der immobilisierten Sortase A (SrtA_{Δ59}_CBD) wurde zunächst mit den synthetisierten Peptiden, dem LPETG- (2) und dem G₂HF-Peptid (1), getestet. Hierfür wurden 100 µl SrtA_{Δ59}_CBD-Beads mit jeweils 300 µM der Peptide, CaCl₂-Lösung (Endkonz. 5 µM) und BS-Puffer zu einem Endvolumen von 300 ml versetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurde der Reaktionsansatz kurz zentrifugiert und der Überstand per RP-HPLC (4.3.10) und MALDI-ToF-MS (4.3.11.1) analysiert.

Des Weiteren wurde die immobilisierte SrtA_{Δ59}_CBD zur Cyclisierung des PhoB^{DBD}-Proteins eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden 2,5 ml SrtA_{Δ59}_CBD-Beads in einer Chromatographie-säule vor der Reaktion mit BS-Puffer und CaCl₂-Zusatz (10 ml BS-Puffer, 5 µM CaCl₂; 1 ml/min) gewaschen. Anschließend wurde in einem Volumen von 2,5 ml 16,8 µM MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Protein in BS-Puffer und CaCl₂ (5 µM) auf die Säule appliziert und die Beads bei 37 °C für 4 h inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch MALDI-ToF-MS (4.3.11.1) und SDS-PAGE (4.3.4).

Tabelle 4.11: Reaktionsansätze zur SML mit immobilisierter SrtA_{Δ59}_CBD

Reaktions- ansatz	SrtA _{Δ59} CBD [ml]	G ₂ HF-Peptid (1) [µM]	LPETG-Peptid (2) [µM]	MG ₂ A_PhoB ^{DBD} _LPSTG [µM]	Inkubationszeit [h]
r	0,1	300	300	-	24
s	1,5	-	-	16,8	4

5. Ergebnisse und Diskussion

Als Modellsystem zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen wurde in dieser Arbeit die DNA-bindende Domäne (DBD) des Transkriptionsfaktors PhoB aus *E. coli* verwendet. Um die Protein-DNA-Wechselwirkungen auf molekularer und struktureller Ebene zu untersuchen, wurden PhoB^{DBD}-Mutanten mit verschiedenen Techniken auf ihre DNA-Bindung analysiert und mit dem Wildtyp des PhoB^{DBD}-Proteins verglichen.

Des Weiteren wurde die Sortase-vermittelte Protein-Modulation zur Darstellung eines cyclischen PhoB^{DBD}-Proteins eingesetzt, welches in Hinblick auf seine DNA-bindenden Eigenschaften analog zu den PhoB^{DBD}-Mutanten charakterisiert werden sollte. Die Aktivität der Sortase A wurde zuvor mit einem Testsystem nachgewiesen und die Transpeptidierungsreaktion dadurch etabliert.

5.1. Darstellung von PhoB^{DBD}-Proteinen

5.1.1. Herstellung von PhoB^{DBD}-Protein Mutanten

Ein Alaninscan einzelner Aminosäuren des PhoB^{DBD}-Proteins, die laut Röntgenstruktur- und NMR-Analysen an der Bindung der *pho box*-DNA beteiligt sind, wurde zur Analyse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen durchgeführt. Röntgenstruktur- und NMR-Analysen zeigten, dass die Interaktionen einzelner Aminosäuren durch Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und spezifische Wechselwirkungen stattfinden, die zum Teil auch durch Wassermoleküle mediiert werden. [3,20,21] Dabei ist das *winged helix-turn-helix*-Motiv der DNA-bindenden Domäne hauptsächlich an der DNA-Bindung beteiligt. Um den Beitrag einzelner Aminosäureseitenketten an der DNA-Bindung zu untersuchen, wurden vier Aminosäuren modifiziert, die laut Kristallstruktur das TGTCA-Motiv der großen Furche der *pho box*-DNA adressieren. Die ausgewählten Aminosäuren interagieren über eine oder mehrere Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Phosphatrückgrat der DNA. Teilweise werden diese Interaktionen auch durch Wassermoleküle mediiert (vgl. Abbildung 5.1).

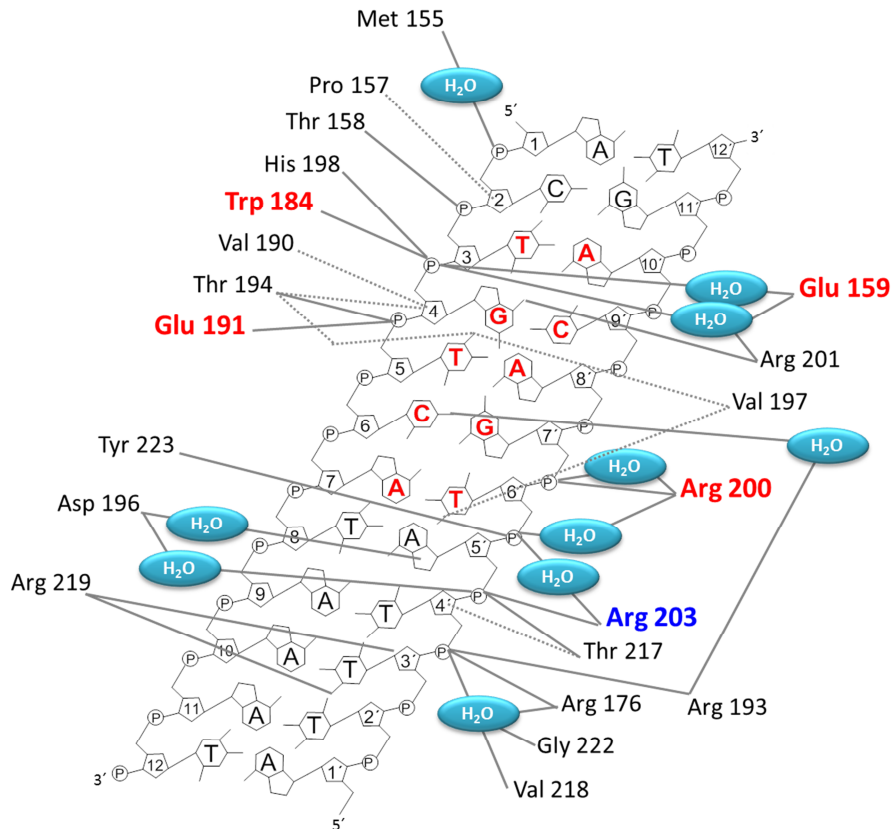


Abbildung 5.1: Schematischer Überblick der mutierten PhoB^{DBD} Aminosäureseitenketten und deren Interaktion mit der *pho box*-DNA

Aminosäuren, die in dieser Arbeit modifiziert wurden, sind rot hervorgehoben. Durchgezogene Linien weisen auf Wasserstoffbrückenbindungen und gepunktete Linien auf hydrophobe Wechselwirkungen hin. Das TGTC-A-Motiv der großen Furche ist durch rote Nukleinbasen gekennzeichnet. Die Aminosäure Arg203, die als Negativkontrolle in den DNA-Interaktionsanalysen eingesetzt wurde, ist zusätzlich in blau hervorgehoben. ^[3]

Die entsprechenden Punktmutanten des PhoB^{DBD}-Wildtyps wurden hergestellt, in dem jeweils die Aminosäure, Glutaminsäure Glu159, Tryptophan Trp184, Glutaminsäure Glu191 oder Arginin Arg200, molekularbiologisch gegen Alanin substituiert wurde. Alanin wurde als Substitutionspartner gewählt, da es sich um eine sterisch wenig anspruchsvolle, neutrale Aminosäure handelt, die die Sekundärstruktur des Proteins nicht signifikant beeinträchtigen sollte. Weiterhin bildet Alanin keine zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen mit der DNA aus. ^[132]

Das Wildtyp PhoB^{DBD}-Protein wurde von Frau Dr. Katrin Wollschläger durch Klonierung der entsprechenden DNA-Sequenz in den pTWIN2-Vektor hergestellt und bereits erfolgreich in Interaktionsstudien eingesetzt. ^[99,133] Als Negativkontrolle der Protein-DNA-Interaktionsanalysen wurde die ebenfalls von Frau Dr. Katrin Wollschläger hergestellte und

charakterisierte Mutante PhoB^{DBD}_R203A verwendet. Die entsprechende Aminosäure Arg203 ist in der OmpR-PhoB-Familie hochkonserviert. [20,133] Die Ergebnisse der Interaktionsstudien von Dr. Katrin Wollschläger konnten belegen, dass diese Aminosäure für die DNA-Bindung essentiell ist. [133]

In dieser Arbeit wurde zur Herstellung der Punktmutanten das oben genannte Wildtypkonstrukt pPhoB^{DBD}_WT als Ausgangsvektor verwendet. Die Mutationen wurden durch *primer* (siehe Tabelle 3.3), die die jeweilige Mutation zu Alanin enthalten, mittels ortsgerichteter Mutagenese-PCR eingefügt. Die hergestellten Plasmide wurden per Sequenzierung auf die richtige, mutierte Sequenz analysiert. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA ergab, dass positive Klone der Mutanten pPhoB^{DBD}_E159A, pPhoB^{DBD}_W184A, pPhoB^{DBD}_E191A, und pPhoB^{DBD}_R200A sequenziert wurden. Die benötigten Methoden zur Durchführung der gesamten Klonierung sind in den Abschnitten 4.1 und 4.2 beschrieben.

Die hergestellten Plasmide basieren auf den pTWIN2-Vektor, der die Fusion der PhoB^{DBD}-Punktmutanten mit C-terminalem Intein und anschließender Chitin-Bindedomäne ermöglichte. Dabei diente die Chitin-Bindedomäne (CBD) als Affinitäts-*tag* zur Bindung an Chitin-Beads. Über das Intein kann anschließend der natürliche Mechanismus des Proteinspleißens zur Aufreinigung der PhoB^{DBD}-Proteine genutzt werden. Dieses Intein ist durch Mutation derart verändert worden, dass eine Spaltung gezielt durch Zugabe von Thiolen induziert werden kann und das Zielprotein Protein ohne Aufreinigungs-*tag* erhalten wird. [66] Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass durch diese Aufreinigungsmethode ein C-terminaler Thioester erhalten wird, welcher auch zur Ligation des Proteins durch native-chemische Ligation eingesetzt werden könnte (siehe auch EPL, 1.3.1).

5.1.2. Expression von PhoB^{DBD}-Proteinen

Zur Expression der PhoB^{DBD}-Proteine wurden die entsprechenden Plasmide durch molekularbiologische Methoden erhalten und in kompetente *E. coli* ER2566 transformiert. Die Expression der rekombinanten PhoB^{DBD}-Proteine erfolgte, wie in 4.1.6 beschrieben, in Ampicillin-haltigem LB-Medium im 1,6 l Maßstab. Das LB-Medium wurde jeweils mit Übernachtskulturen der mit entsprechenden transformierten PhoB^{DBD}-Konstrukten transformierten *E. coli* ER2566 angeimpft. Die Expression des gewünschten Fusionsproteins aus dem jeweiligen PhoB^{DBD}-Protein, dem Intein und der Chitin-Bindedomäne, wurde in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zugabe von β -Isopropylthio-D-galactopyranosid (IPTG) initiiert, da die auf dem pTWIN2-Vektor basierenden Konstrukte unter der Kontrolle eines Lac-Repressor regulierten T7-Promoters stehen. Erst durch die Bindung von IPTG an

den Lac-Repressor wird die Transkription des Fusionsproteins durch die T7-Polymerase der *E. coli* ER2566 ermöglicht. Zur Bestimmung der optischen Dichte der Kultur wurde die Absorption bei 600 nm (OD_{600}) in regelmäßigen Zeitabständen gemessen (4.1.2). Abbildung 5.2 zeigt die Wachstumskurve der Expression von PhoB^{DBD}_WT, in der bei 160 min in der logarithmischen Wachstumsphase mit IPTG (Endkonz. 0,5 mM) induziert wurde.

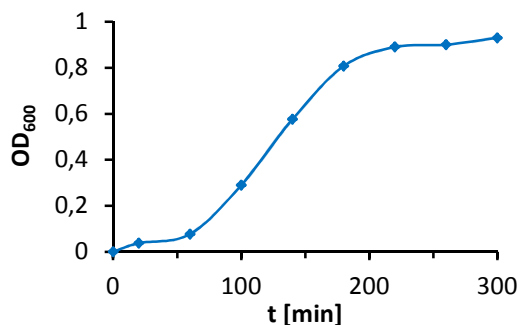


Abbildung 5.2: Wachstumskurve der Kultivierung von *E. coli* zur Expression von PhoB^{DBD}_WT

Die Probenentnahme und Messung der A_{600} erfolgte alle 20 min. Bei einer OD_{600} von 0,628 nach 160 min wurde die Expression des Fusionsproteins mit IPTG induziert.

Vergleichbar mit der Expression des Wildtyps wurde bei allen Mutanten die logarithmische Wachstumsphase bei einer $OD_{600} = 0,5 - 0,7$ erreicht und die Expression der PhoB^{DBD}-Proteine jeweils durch Zugabe von IPTG initiiert. Nach weiterer Kultivierung für 4 h bei 30 °C zur Expression der rekombinanten Proteine, konnten die Bakterien durch Zentrifugation geerntet werden. Das Bakteriensediment wurde in B2-Lysepuffer resuspendiert, schockgefroren und bei -80 °C bis zur Aufreinigung gelagert. Der Verlauf der Expressionen wurde mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft. Exemplarisch ist in Abbildung 5.3 die Expression des PhoB^{DBD}_WT-Proteins dargestellt. In den Spuren 1 – 8 wurden die Expressionskontrollen einer vier stündigen Expression und die entsprechenden Proben vor IPTG-Induktion aufgetragen. Die Spuren 1 und 2 zeigen die ersten beiden Stunden der Kultivierung. Nach zwei Stunden wurde die Expression durch Zugabe von IPTG induziert. Die Spuren 3 – 6 zeigen die stündlich genommenen Proben der Expression, in denen eine Zunahme der Banden in Höhe von ~ 32 kDa und ~ 12 kDa zu sehen ist. Die Bande bei ~ 32 kDa ist dem Fusionsprotein aus Intein und CBD zuzuordnen. Das Zielprotein PhoB^{DBD}_WT hat eine erwartete Masse von 12,2 kDa. Bereits während der Expression (Spur 3 – 6) ist eine Bande dieser Masse zu erkennen. Dies ist dadurch begründet, dass das Zielprotein teilweise bereits durch die Probenbehandlung mit β -Mercaptoethanol für die SDS-PAGE von dem Fusionsprotein aus PhoB^{DBD}, Intein und CBD durch das Thiol abgespalten wurde (vgl. Thiol-induzierbare Spaltung des Inteins 5.1.3).

In Spur 7 ist das Lysat der Bakterien vor der Aufreinigung aufgetragen. Auch in dieser Probe ist eine deutliche Bande des abgespaltenen PhoB^{DBD}-Proteins zu erkennen. Zum Vergleich der PhoB^{DBD}-Protein-Bande in Höhe von ~12 kDa ist in Spur 8 das aufgereinigte PhoB^{DBD}_WT Protein aufgetragen.

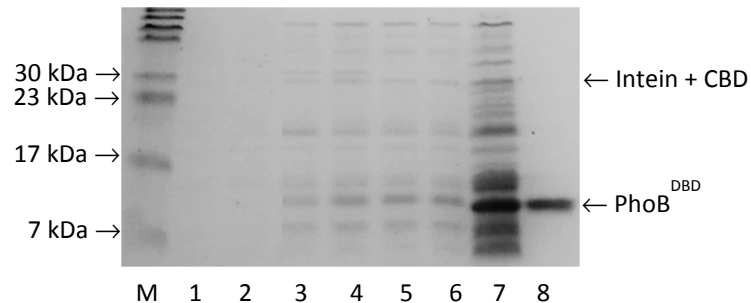


Abbildung 5.3: Expressionskontrolle der Kultivierung des PhoB^{DBD}_WT-Proteins mittels SDS-PAGE

Die Expression des PhoB^{DBD}_WT wurde über SDS-PAGE kontrolliert. In den Spuren 1 und 2 ist die Kultivierung der ersten zwei Stunden zu sehen. Nach zwei Stunden wurde die Expression des Zielproteins durch IPTG Zugabe induziert. Die Spuren 3 bis 6 zeigen die Bildung des Fusionsproteins aus Intein und CBD (~32 kDa) über 4 h Kultivierung. Zusätzlich ist die Bande bei ~12 kDa des PhoB^{DBD}-Proteins zu sehen, welches durch die Probenbehandlung bereits vom Fusionsprotein abgespalten wurde. In Spur 7 mit einer deutlichen Bande des PhoB^{DBD}-Proteins (~12 kDa), ist das Lysat vor der Aufreinigung aufgetragen. Zum Vergleich wurde in Spur 8 das aufgereinigte PhoB^{DBD}_WT-Protein aufgetragen. 18 %iges SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie.

5.1.3. Aufreinigung von PhoB^{DBD}-Proteinen durch Intein-vermitteltes Proteinspleißen

Die Aufreinigung der PhoB^{DBD}-Proteine erfolgte mit Hilfe des pTWIN-Systems durch Intein-vermitteltes Proteinspleißen (siehe auch EPL, 1.3.1). Die hergestellten pTWIN2-Konstrukte bestehen aus dem jeweiligen PhoB^{DBD}-Protein mit C-terminalem Intein und Chitin-Bindedomäne (CBD). Die PhoB^{DBD}-Proteine wurden unter Verwendung des IMPACT-TWIN Protokolls aufgereinigt (4.3.2.1).^[105] Über CBD wurde das Fusionsprotein an eine Chitin-Beads-Matrix (NEB, Frankfurt a. M.) gebunden. Durch einen Waschlauf wurden unspezifisch gebundene Proteine und Verunreinigungen entfernt. Die Abspaltung der rekombinanten PhoB^{DBD}-Proteine erfolgte durch die Thiol-induzierte Spaltung des Inteins mit einem MESNA-haltigen Thiolreagenz (vgl. Abbildung 4.1). Die eluierten Fraktionen wurden aufgefangen, mit Hilfe des Bradford-Schnelltests auf ihren Proteingehalt und per SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft. Ein Beispiel des aufgereinigten PhoB^{DBD}_WT-Proteins ist in Abbildung 5.3, Spur 8, gezeigt. Die Konzentration der Proteinlösungen nach Vereinigung der

reinsten Fraktionen wurde mit dem NanoDrop bestimmt. Die Ausbeuten der Expressionen der PhoB^{DBD}-Mutanten betragen 1 – 2 mg pro Liter Kulturmedium und sind mit den Ausbeuten der Expression des Wildtyps (2 mg) vergleichbar.

Abbildung 5.4 zeigt das MALDI-ToF-MS-Spektrum des PhoB^{DBD}_WT-Proteins. Die erwartete theoretische Masse für das Wildtyp Protein beträgt $m/z = 12157 [M+H]^+$, detektiert wurde hier eine Masse von $m/z = 12156 [M+H]^+$. Somit konnte bestätigt werden, dass die Expression und die Aufreinigung des PhoB^{DBD}-Wildtyps erfolgreich war. Dergleichen wurden die Expressionen und Aufreinigungen der weiteren PhoB^{DBD}-Proteine per MALDI-ToF-MS-Messung analysiert. Ein Vergleich der detektierten und der erwarteten Massen belegt die erfolgreiche Darstellung der PhoB^{DBD}-Proteine (vgl. Tabelle 5.1). Die Mutanten PhoB^{DBD}_E159A, PhoB^{DBD}_W184A, PhoB^{DBD}_E191A, PhoB^{DBD}_R200A und PhoB^{DBD}_R203A konnten demzufolge erfolgreich dargestellt werden.

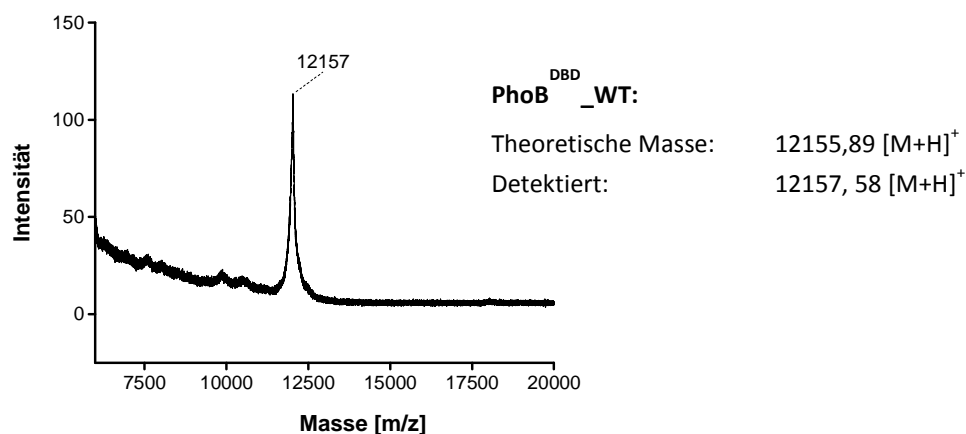


Abbildung 5.4: Ergebnis der MALDI-ToF-MS Untersuchung des PhoB^{DBD}_WT-Proteins

Die erfolgreiche Aufreinigung des PhoB^{DBD}_WT-Proteins konnte durch MALDI-ToF-MS-Analyse bestätigt werden. Der detektierte Wert von $m/z = 12156$ entspricht dem theoretischen Wert der Masse des Proteins.

Tabelle 5.1: Ergebnisse der MALDI-ToF-MS-Messungen der PhoB^{DBD}-Punktmutanten

Die theoretischen, durchschnittlichen Massen $[M+H]^+$ beziehen sich auf die Aminosäuren 126 - 229 der PhoB^{DBD}-Proteine.

PhoB ^{DBD}	theoretische Masse [m/z]	detektierte Masse [m/z]
PhoB ^{DBD} _WT	12156	12157
PhoB ^{DBD} _E159A	12098	12099
PhoB ^{DBD} _W184A	12041	12043
PhoB ^{DBD} _E191A	12098	12096
PhoB ^{DBD} _R200A	12071	12068
PhoB ^{DBD} _R203A	12071	12072

5.2. DNA-Oligonukleotide für die Interaktionsanalyse

In vivo binden zwei PhoB-Proteine als Dimer spezifisch an *pho box*-DNA Sequenzen, die im Promotor-Bereich von *pho*-Regulons liegen. Ein Vergleich verschiedener *pho*-Regulons wie *phoA*, *phoH* und *pstS* zeigt eine Konsensus-Sequenz, die zwei hoch-konservierte charakteristische TGTCA-Motive, jeweils gefolgt von A/T-reichen Sequenzen beinhaltet (vgl. Abbildung 1.3). Dabei zeigt sich eine leichte Divergenz in der A/T-reichen Region der verschiedenen Regulons. [22] Strukturell betrachtet liegen die TGTCA-Motive in der großen Furche (*major groove*) und die A/T-reichen Regionen in der kleinen Furche (*minor groove*) der DNA-Helix. Um die Beiträge einzelner Aminosäureseitenketten der DNA-Bindedomäne des PhoB-Proteins an der DNA-Bindung zu analysieren, wurden DNA-Moleküle verwendet, die auf der *pho box*-Sequenz des *pstS*-Regulons basieren. Dabei sollte die Interaktion des Proteins mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden, MmMm und MmXx, verglichen werden. Die **MmMm**-DNA weist zwei komplette Bindestellen, bestehend aus jeweils einem TGTCA-Motiv (**M** = *Major groove*) und einer in 3'-Richtung folgenden A/T-reichen Region (**m** = *minor groove*) auf. Im Gegensatz dazu weist die **MmXx**-DNA nur eine vollständige Bindestelle auf (X = randomisierte Sequenz). Zur Kontrolle der Spezifität der Erkennung der Oligonukleotide wurde zusätzlich die XxXx-DNA mit einer vollständig randomisierten Sequenz verwendet, die dementsprechend keine Bindestelle für das PhoB-Protein aufweist. Einen Überblick der verwendeten Oligonukleotidsequenzen liefert die Tabelle 5.2. Die Oligonukleotide weisen jeweils eine Länge von jeweils 24 bp auf. Diese DNA-Moleküle wurden bereits erfolgreich durch Herrn Dr. Ritzefeld in SPR-Messungen zur Interaktionsanalyse eingesetzt. [134]

Tabelle 5.2: Sequenzen analysierter DNA-Moleküle

DNA-Moleküle mit ein, zwei und keiner Bindestelle für das PhoB^{DBD}-Protein. Eine Bindestelle besteht aus der TGTCA-Konsensussequenz (rot) und einer A/T-reichen Region (blau). **M** bedeutet dabei *Major groove* (große Furche), **m** steht für *minor groove* (kleine Furche) und X/x für randomisierte Sequenz.

Name	Beschreibung	Sequenz (5' → 3')
MmMm	<i>pho box</i> -DNA mit zwei Bindestellen	CTGTCA ^{rot} TAAA ^{blau} ACTGT ^{rot} CATATT ^{blau} CCT
MmXx	<i>pho box</i> -DNA mit einer Bindestelle	CTGTCA ^{rot} TAAA ^{blau} CGAGGCAGCATCT
XxXx	randomisierte DNA-Sequenz	CGAGGCAGCATACGGATCCGAGGC

5.3. Untersuchung der Struktur und DNA-Interaktionen der PhoB^{DBD}-Proteine mittels CD

Die CD-Spektroskopie ermöglicht mit nur geringen Proteinkonzentrationen Informationen über Sekundärstrukturen zur Konformation und Stabilität von Proteinen zu erhalten. Daher wurde in dieser Arbeit die CD-Spektroskopie verwendet, um eine einfache und schnelle Analyse von Sekundärstrukturmerkmalen zu erhalten. Diese wurden zum Vergleich des Wildtyp-Proteins mit den Mutanten verwendet. Auch die Analyse zur DNA-Bindung der PhoB^{DBD}-Proteine an die *pho box*-DNA wurde mittels CD-Messungen durchgeführt.

5.3.1. Analyse der Protein-Sekundärstrukturen

Bevor die DNA-Bindung der einzelnen PhoB^{DBD}-Proteine untersucht wurde, wurden die Konformation und die einzelnen Sekundärstrukturelemente mit Hilfe der CD-Spektroskopie analysiert. Ein Vergleich der Konformationen der fünf hergestellten Punktmutanten des PhoB^{DBD}-Proteins mit dem Wildtyp sollte mögliche Variationen in der Sekundärstruktur aufzeigen. Zur Untersuchung der Sekundärstrukturmerkmale wurde die Absorption im UV-Bereich von 350 - 190 nm gemessen. Abbildung 5.5 zeigt die CD-Spektren des Wildtyps PhoB^{DBD}_WT und der Mutanten.

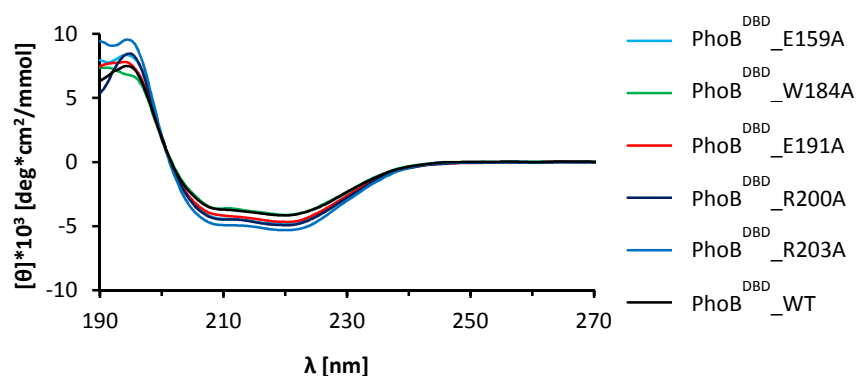


Abbildung 5.5: CD-Spektren des PhoB^{DBD}_WT im Vergleich mit den PhoB^{DBD} Punktmutanten

Zur Kontrolle der Sekundärstrukturen wurden die CD-Spektren des PhoB^{DBD}-Wildtyps mit denen der Punktmutanten verglichen.

Der generelle Kurvenverlauf der CD-Spektren mit zwei Minima (209 und 225 nm) und einem Maximum (195 nm) weist auf einen großen α -helikalen Anteil aller Proteine hin. Ein Vergleich der Spektren des Wildtyps und der Mutanten zeigt keine signifikanten Unterschiede, so dass angenommen werden kann, dass der Austausch einer Aminosäure gegen Alanin in der entsprechenden Mutante keine strukturellen Unterschiede induziert. Folglich sind alle Variationen bezüglich der Interaktion mit der DNA nicht auf Änderungen in der Sekundärstruktur des Proteins, sondern auf die Deletion der entsprechenden Wechselwirkung der Aminosäureseitenkette mit der DNA zurückzuführen.

Ferner wurden aus den Spektren die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente mit Hilfe des Algorithmus nach Chen und Yang extrahiert. [120] Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Die erhaltenen Werte wurden über drei Messungen gemittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass der Anteil an α -helikalen Strukturen des Wildtyps und im Fall der Mutanten im Bereich von 32 % \pm 5 % liegen. Der Anteil an β -Faltblättern des Wildtyps liegt bei 39 %. Die Mutanten zeigen alle leicht höhere Werte, die aber im Vergleich mit dem Fehlerbereich des Wildtyps keinen signifikanten Unterschied ausmachen. Die Anteile der Sekundärstrukturelemente des PhoB^{DBD}-Wildtyp Proteins, die aus den Ergebnissen der NMR- und röntgenkristallographischen-Untersuchung extrahiert werden konnten, liegen bei 36 % für α -helikale Strukturen und bei 27 % für β -Faltblätter. [20] Ein Vergleich mit den vermessenen PhoB-Proteinen zeigt eine Übereinstimmung der Anteile an α -helikalen Strukturen. In Bezug auf die Anteile an β -Faltblättern weichen die hier analysierten Proteine zwar signifikant ab, zeigen aber untereinander keinen relevanten Unterschied.

Dementsprechend war eine ausreichende Übereinstimmung der Konformationen der PhoB^{DBD}-Proteine für eine Interaktionsanalyse mit der *pho box*-DNA gegeben und die dargestellten Mutanten eigneten sich für einen Vergleich mit dem PhoB^{DBD}-Wildtyp Protein.

Tabelle 5.3: Prozentuale Anteile an Sekundärstrukturelemente der PhoB^{DBD}-Proteine

Mittelwerte aus drei Messungen der prozentualen Anteile an Sekundärstrukturelementen mit Standardabweichung (+/- %).

Konformation	% α -Helix	% β -Faltblatt	% Schleife	% <i>random</i>
PhoB ^{DBD} _WT	32,0 +/- 3,2	38,8 +/- 5,5	8,3 +/- 1,1	20,8 +/- 3,1
PhoB ^{DBD} _E159A	33,8 +/- 3,0	43,7 +/- 1,5	0,8 +/- 1,0	21,9 +/- 1,1
PhoB ^{DBD} _W184A	35,9 +/- 4,0	40,2 +/- 5,8	2,5 +/- 1,2	21,4 +/- 1,1
PhoB ^{DBD} _E191A	33,3 +/- 0,4	42,0 +/- 4,2	2,6 +/- 2,7	22,1 +/- 1,8
PhoB ^{DBD} _R200A	30,7 +/- 1,8	41,8 +/- 1,1	6,7 +/- 1,6	20,8 +/- 0,9
PhoB ^{DBD} _R203A	29,3 +/- 1,8	42,6 +/- 1,1	4,6 +/- 3,0	23,6 +/- 3,9

5.3.3. Untersuchung der Protein-DNA-Komplexbildung

In dieser Arbeit sollte die Protein-DNA-Interaktion von PhoB^{DBD}-Proteinen untersucht werden. Die Interaktion des PhoB^{DBD}-Proteins mit der *pho box*-DNA resultiert in einem Komplex, in dem die Konformation der DNA verändert ist. Ergebnisse der NMR- und Röntgenstruktur-Analyse zeigen, dass sich die Konformation des PhoB^{DBD}-Proteins durch die DNA-Bindung nur geringfügig innerhalb des flexiblen *loops* ändert. [3,20] Im Gegensatz dazu wird die DNA durch die Bindung des Proteins gebeugt, was für die Interaktionsanalyse mittels CD-Spektroskopie genutzt werden kann. [20] Die vermessene MmMm-DNA besitzt zwei vollständige PhoB-Bindestellen, die auf der *pho box* des *pstS*-Operons basieren (vgl. 5.2). Zur Kontrolle der spezifischen Erkennung der PhoB-Erkennungssequenz wurde die XxXx-DNA mit randomisierter Sequenz eingesetzt.

Um eine Änderung der Struktur der MmMm-DNA mittels CD-Messungen zu detektieren, wurden Spektren der Protein-DNA-Komplexe vermessen. Von diesen Spektren wurden die reinen Proteinspektren gleicher Konzentration subtrahiert und so Differenzspektren generiert, die eine Analyse der Strukturänderungen der DNA bei Komplexbildung erlauben. Das Differenzspektrum des PhoB^{DBD}-Wildtyps mit der *pho box*-DNA MmMm ist in Abbildung 5.6 A dargestellt. Betrachtet man den Kurvenverlauf der DNA ohne Protein (rot), zeigt dieser den typischen Verlauf einer B-Typ DNA mit einem ausgeprägten Minimum bei 245 nm und einem vergleichbar ausgeprägten Maximum bei 275 nm. Wird der Kurvenverlauf der reinen DNA mit dem der Komplexe bei verschiedenen DNA-Protein Verhältnisse verglichen, zeigt sich, dass sich die Amplitude des Minimums bei 245 nm und des Maximums bei 275 nm mit steigender Proteinkonzentration vergrößert. Zusätzlich wird das Maximum um ~ 2 nm zu 277 nm verschoben. Somit belegen die CD-spektroskopischen Ergebnisse die Resultate der NMR- und Röntgenstrukturanalyse, dass die DNA im Komplex mit dem Protein in einer gebeugten Konformation vorliegt. Im Fall des Oligonukleotids XxXx ist keine Variation der Amplitude bei steigender Proteinkonzentration nachweisbar (vgl. Abbildung 5.6 B). Da in diesem Versuchsansatz die Kontroll-DNA XxXx mit randomisierter Sequenz verwendet wurde, belegt dieses Ergebnis, dass keine spezifischen Interaktionen zwischen dem Transkriptionsfaktor und dem randomisiertem Oligonukleotid vorliegen.

Das PhoB^{DBD}_WT-Protein bindet somit spezifisch an die *pho box*-Sequenz mit den zwei TGTCA-Erkennungsmotiven und nicht an die randomisierte Sequenz.

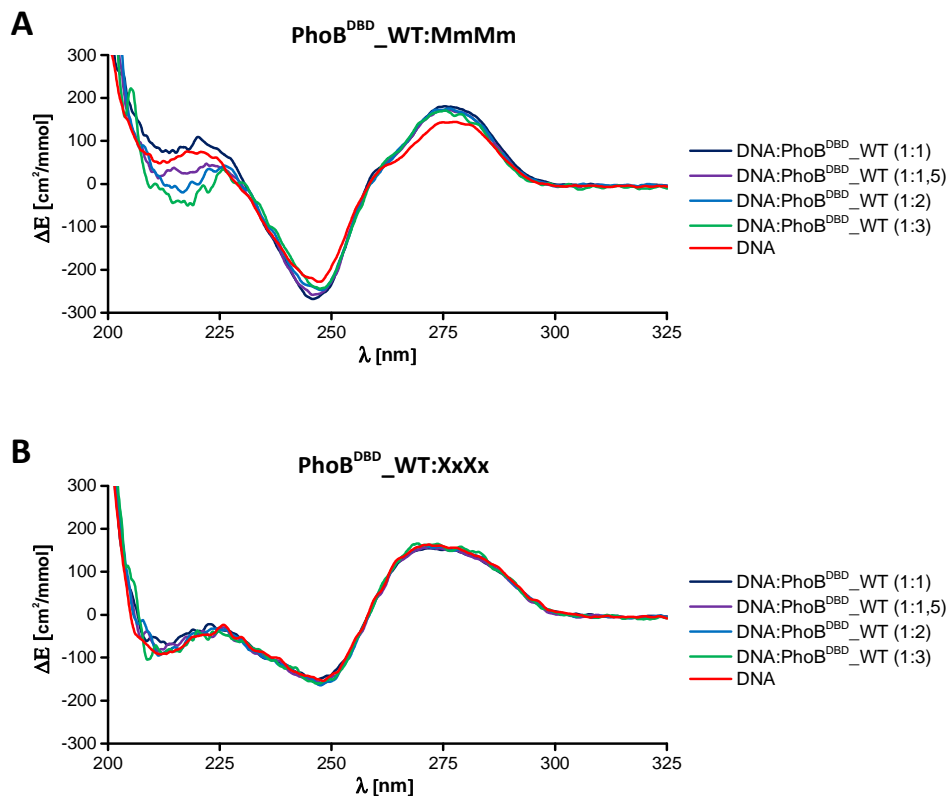


Abbildung 5.6: Untersuchung der DNA-Bindung des PhoB^{DBD}_WT-Proteins mittels CD-Spektroskopie
A Differenzspektren der MmMm-DNA und der Komplexe aus MmMm-DNA und PhoB^{DBD}-Wildtyp in verschiedenen Verhältnissen zur Analyse der Protein-DNA-Bindung. **B** Differenzspektren der XxXx-DNA analog zu **A**.

In weiteren CD-Experimenten wurde die Mutante PhoB^{DBD}_R203A als Negativkontrolle eingesetzt. Abbildung 5.7 A zeigt die Ergebnisse der Messung des PhoB^{DBD}_R203A-Proteins mit der MmMm-DNA. Vergleicht man die Spektren der DNA ohne Protein (rot) mit den Ergebnissen der Protein-DNA-Komplexe, so ist keine signifikante Änderung der Kurvenverläufe der Differenzspektren zu erkennen. Diesbezüglich interagiert das Protein PhoB^{DBD}_R203A, wie erwartet, auch nicht mit der randomisierten Sequenz der XxXx-DNA (vgl. Abbildung 5.7 B).

Laut den Ergebnissen der Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie bildet Arginin 203 unter Beteiligung eines Wassermoleküls eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Phosphatgruppe des T4'-Thymins der großen Furche und eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Phosphatrest des A5'-Adenins der kleineren Furche der *pho box*-DNA (vgl. Abbildung 5.1). [3]

Zusätzlich bestehen auch intramolekulare Interaktionen dieser Aminosäure zu Aminosäuren Thr217 und Val218 des C-terminalen β -hairpins. Dadurch wird die Orientierung der Sekundärstrukturelemente zueinander stabilisiert, welche für die DNA-Erkennung verantwortlich sind. [20] Der Verlust dieser Interaktionen durch die Substitution von Arginin an Position 203 zu Alanin resultiert darin, dass die Mutante PhoB^{DBD}_R203A nicht an die *pho box*-DNA bindet. Die Aminosäure Arg203 des PhoB^{DBD}-Proteins ist somit essentiell für die DNA-Bindung.

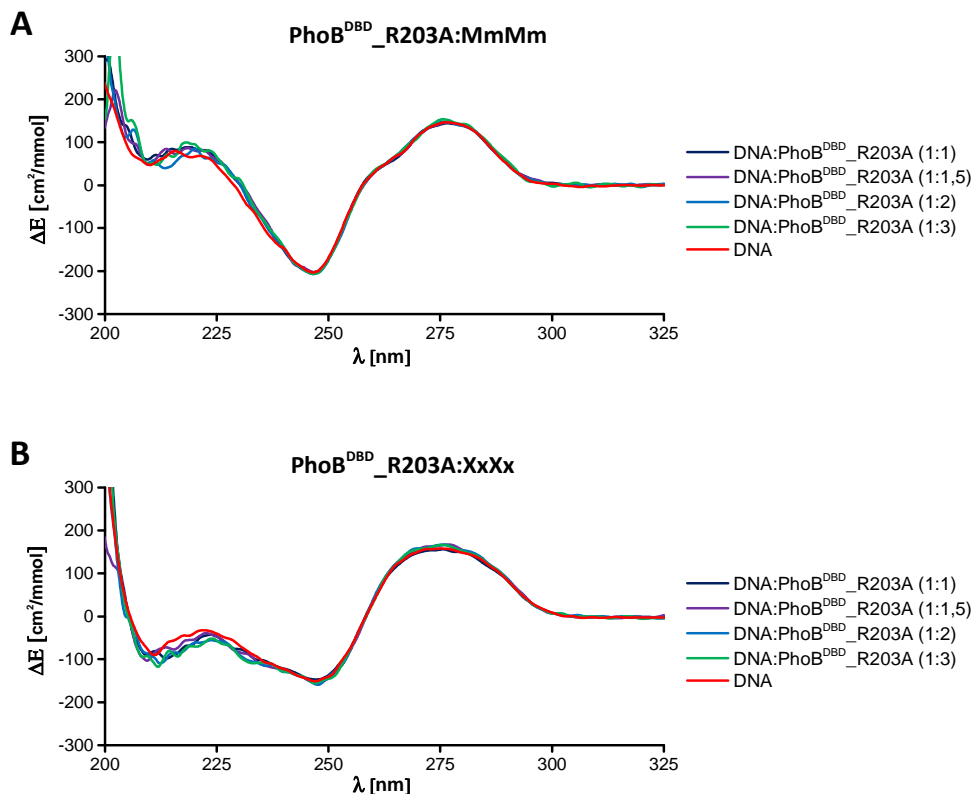


Abbildung 5.7: Untersuchung der DNA-Bindung von PhoB^{DBD}_R203A mittels CD-Spektroskopie

A Differenzspektren der MmMm-DNA und der Komplexe aus MmMm-DNA und PhoB^{DBD}_R203A in verschiedenen Verhältnissen zur Analyse der Protein-DNA-Bindung. **B** Differenzspektren der XxXx-DNA analog zu **A**.

Um die Interaktion einzelner, an der DNA-Bindung beteiligter Aminosäureseitenketten zu untersuchen, wurden die Alanin-Punktmutanten des PhoB^{DBD}-Wildtyps analysiert. Die Interaktion der mutierten Proteine, PhoB^{DBD}_E159A, PhoB^{DBD}_W184A, PhoB^{DBD}_E191A und PhoB^{DBD}_R200A wurde ebenfalls mit den Oligonukleotiden MmMm und XxXx mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Abbildung 5.8 zeigt exemplarisch die Differenzspektren der Mutante PhoB^{DBD}_W184A.

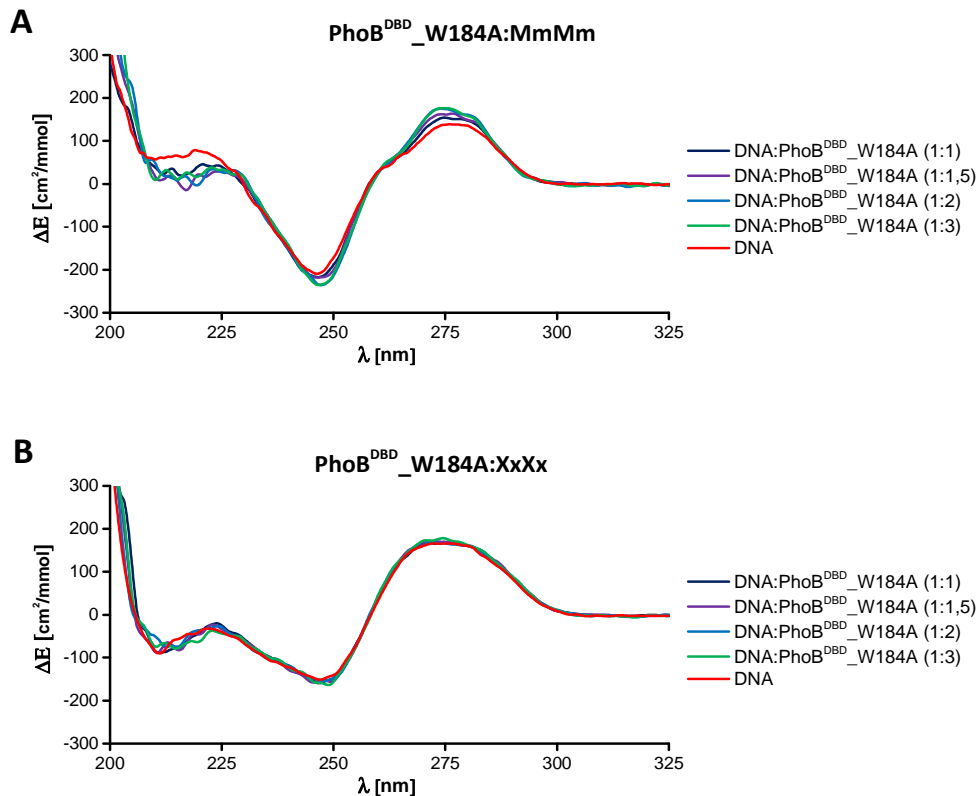


Abbildung 5.8: Untersuchung der DNA-Bindung von PhoB^{DBD}_W184A mittels CD-Spektroskopie

A Differenzspektren der MmMm-DNA und der Komplexe aus MmMm-DNA und PhoB^{DBD}_W184A in verschiedenen Verhältnissen zur Analyse der Protein-DNA-Bindung. **B** Differenzspektren der XxXx-DNA analog zu **A**.

Betrachtet man die CD-Spektren der MmMm-DNA ohne Protein (rot), zeigt sich der Kurvenverlauf einer B-Typ DNA (Abbildung 5.8 A). Vergleichbar zum Wildtyp vergrößern sich auch hier bei steigender Proteinkonzentration die Amplituden bei 245 nm und bei 275 nm, was belegt, dass diese Mutante die MmMm-DNA bindet. Das Differenzsensogramm der Messung von PhoB^{DBD}_W184A mit der XxXx-DNA zeigt in Abbildung 5.8 B einen unveränderten Kurvenverlauf und dadurch keine DNA-Bindung. Somit ist die DNA-Bindung der Mutante PhoB^{DBD}_W184A an die MmMm-DNA spezifisch.

Die weiteren Mutanten, PhoB^{DBD}_E159A, PhoB^{DBD}_E191A und PhoB^{DBD}_R200A, zeigen alle zum Wildtyp und PhoB^{DBD}_W184A vergleichbare Differenzspektren mit signifikant vergrößerten Amplituden (Spektren im Anhang, Abbildung 8.1)

Daraus kann geschlossen werden, dass alle in dieser Arbeit hergestellten PhoB^{DBD}-Mutanten die *pho box*-DNA mit zwei Bindestellen (MmMm) binden. Der Verlust der Interaktionen der korrespondierenden Aminosäureseitenketten, die laut NMR- und Röntgenstruktur-Analyse an der DNA-Bindung beteiligt sind, erweist sich anhand der CD-Interaktionsexperimente für die DNA-Bindung als nicht essentiell.

5.3.4. Temperaturabhängige CD-Messungen zur Analyse der thermischen Stabilität von PhoB^{DBD}-Proteinen

Die thermische Stabilität der Proteine, insbesondere der Vergleich der Mutanten mit dem Wildtyp-Protein, gab Rückschlüsse auf die Konformation und richtige Faltung der Proteine. Mit einer temperaturabhängigen CD-Messung kann die Denaturierungstemperatur von Proteinen bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden viele Spektren im Verlauf eines Temperaturgradienten gemessen, wobei Proteine ab einer individuellen Temperatur ihre Konformation verlieren und somit denaturieren.

Die thermische Stabilität der Mutante PhoB^{DBD}_E159A wurde bestimmt, da das Protein bei der Quantifizierung der Protein-DNA-Interaktionen mittels SPR eine vom Wildtyp-Protein signifikant abweichende Affinität zur *pho box*-DNA zeigte (siehe 5.4.3). Die Denaturierungstemperatur der Mutante wurde mit den entsprechenden Werten des Wildtyps und des Proteins PhoB^{DBD}_W184A verglichen. Die entsprechenden Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 20 – 90 °C mit den Proteinen PhoB^{DBD}_WT, PhoB^{DBD}_E159A und PhoB^{DBD}_W184A durchgeführt. Die resultierenden CD-Spektren sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Die 3D-Darstellungen zeigen die Veränderungen des CD-Effektes in Abhängigkeit des Temperaturgradienten. Bei tiefen Temperaturen, beginnend bei 20 °C, zeigen alle Proteine ein Maximum bei ca. 195 nm (rot) und ein ausgeprägtes Minimum bei ca. 225 nm (dunkelviolet). Dieser Kurvenverlauf weist auf hohe α -helikale Anteile der Proteine hin und somit auf eine ausgeprägte Sekundärstruktur. Im Verlauf des Temperaturgradienten verringern sich das Maximum und Minimum. Daraus resultieren schwach ausgeprägte Kurvenverläufe (grün). Die Variation des CD-Spektrums belegt, dass die Proteine mit Erhöhung der Temperatur ihre Sekundärstruktur verlieren und ab einer gewissen Temperatur denaturieren.

Die Berechnung der Denaturierungstemperatur erfolgte durch die Umrechnung der molaren Elliptizität zum prozentualen Anteil der Denaturierung bei einer Wellenlänge von 220 nm. Dieser prozentuale Anteil wurde in Abhängigkeit zur Temperatur für die Berechnung der Denaturierungstemperatur mittels nichtlinearer Regression verwendet (Abbildung 5.10). Sowohl das Wildtyp-Protein als auch die Mutante PhoB^{DBD}_W184A zeigen eine thermische Denaturierung ab vergleichbaren Temperaturen von 56,2 °C für den Wildtyp und 57,9 °C für PhoB^{DBD}_W184A. Im Gegensatz dazu denaturiert PhoB^{DBD}_E159A bereits ab einer Temperatur von 35,6 °C.

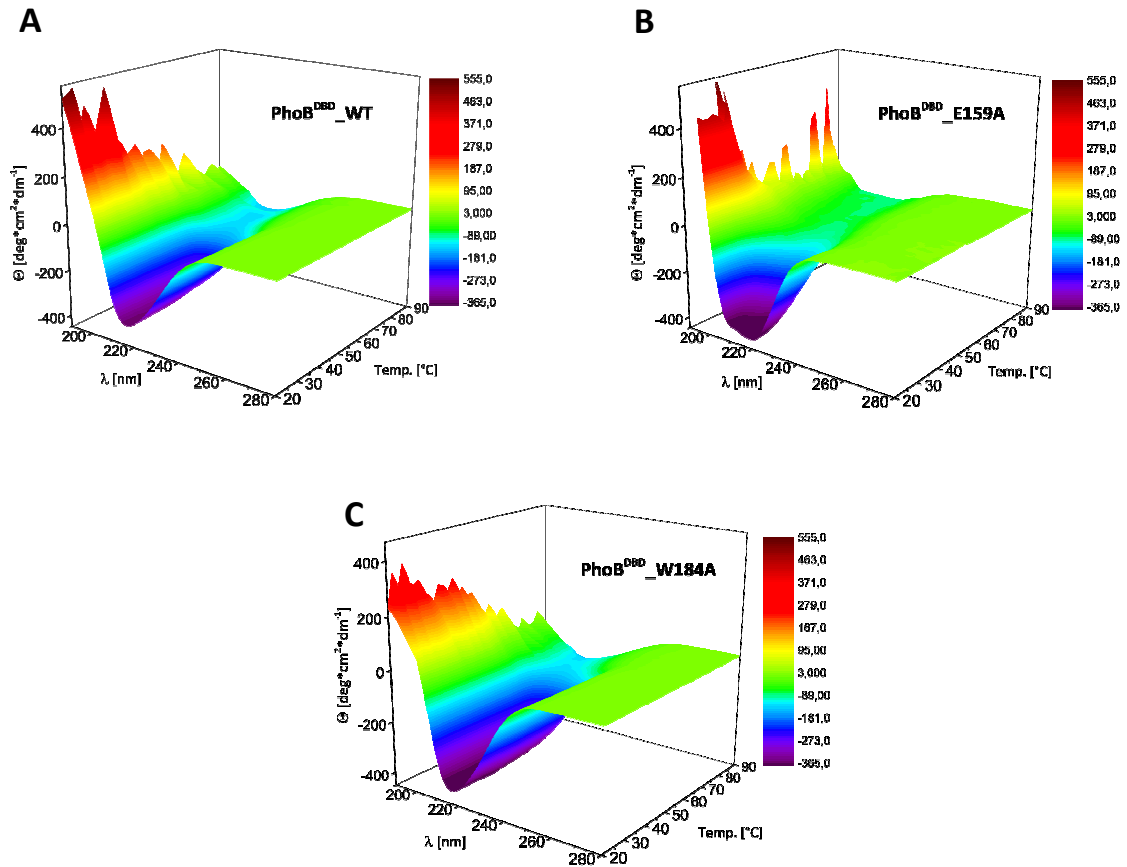


Abbildung 5.9: Temperaturabhängige CD-Messungen des PhoB^{DBD}-Wildtyps und der Mutanten

A-C Dreidimensionale Darstellung der CD-Spektren gemessen im Temperaturbereich von 20 – 90 °C. **A** Spektren des PhoB^{DBD}-Wildtyps. **B** Spektren der Mutante PhoB^{DBD}_E159A. **C** Spektren der Mutante PhoB^{DBD}_W184A.

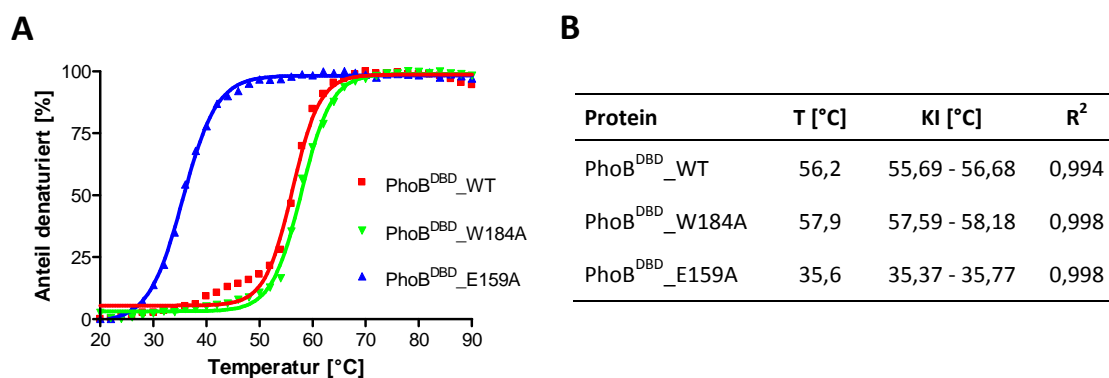


Abbildung 5.10: Denaturierung von PhoB^{DBD}-Proteinen im Verlauf temperaturabhängiger CD-Messungen

A Prozentuale Anteil der Denaturierung der Proteine bei einer gemessenen Wellenlänge von 220 nm im Verlauf des Temperaturgradienten. **B** Berechnete Denaturierungstemperaturen der PhoB^{DBD}-Proteine. (KI = 95 % Konfidenzintervall, R² = Bestimmtheitsmaß)

Die in Absatz 5.3.1 beschriebenen Anteile an Sekundärstrukturelementen zeigten eine gute Übereinstimmung der Konformation aller PhoB^{DBD}-Proteine. Die aus den temperaturabhängigen CD-Spektren extrahierten Denaturierungstemperaturen implizieren, dass die Mutante PhoB^{DBD}_E159A durch eine signifikant geringere Denaturierungstemperatur im Vergleich mit den anderen vermessenen Proteinen charakterisiert ist. Dies belegt, dass die Mutation der Aminosäure Glutaminsäure 159 zu Alanin die Stabilität des PhoB^{DBD}-Proteins negativ beeinflusst.

Laut Ergebnissen der Kristallstruktur- und NMR-Strukturaufklärung interagiert die Seitenkette von Glu159 nicht nur mit dem Phosphatrückgrat der großen Furche.^[3] Zusätzlich besteht durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dieser und Histidin 198 eine intramolekulare Interaktion der α^1 - und α^3 -Helix des PhoB^{DBD}-Proteins, wodurch die Tertiärstruktur des Transkriptionsfaktors stabilisiert wird.^[20] Der Verlust der stabilisierenden Interaktion von Glu159 mit der α^3 -Helix könnte zu einer verringerten Stabilität des Proteins führen, was die geringe Denaturierungstemperatur erklären würde.

5.4. Untersuchung der PhoB^{DBD}-DNA-Interaktion mittels SPR

Der Einsatz der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) erlaubt eine markierungsfreie Analyse molekularer Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen. So können durch SPR-Messungen Daten zur Spezifität und Affinität der Interaktion von Biomolekülen generiert werden. In dieser Arbeit wurde die Methode zur Analyse der Interaktionen der PhoB^{DBD}-Proteine mit der *pho box*-DNA verwendet. Dabei sollten die Affinitäten des Wildtyp Proteins und der verschiedenen Mutanten verglichen werden, um so differenzierte Aussagen zur Beteiligung einzelner Aminosäureseitenketten an der DNA-Bindung treffen zu können.

5.4.1. Immobilisierung der Oligonukleotide

Die Immobilisierung der auf der *pho box*-Sequenz des *pstS*-Regulons basierenden DNA-Moleküle wurden nach dem von Frau Dr. Katrin Wollschläger und Herrn Dr. Markus Ritzefeld optimierten Parametern durchgeführt. Bei der Assay-Optimierung zeigte sich, dass die Verwendung eines SA-Sensorchips mit funktionalisierter Streptavidin-Oberfläche und die Immobilisierung von biotinylierter DNA für die Interaktionsanalyse am erfolgreichsten waren. Weiterhin konnte durch die Verwendung kurzer DNA-Fragmente (18/24 bp) und eines Beladungsgrades von ca. + 400 RU die unspezifische Bindung der zu analysierenden Proteine minimiert werden. Für reproduzierbare Sensogramme bei mehrmaliger Verwendung eines präparierten Sensorchips zeigte sich eine Verwendung von 0,05 % SDS in Laufpuffer als Regenerierungslösung als optimal. [22,135]

In dieser Arbeit wurden die zwei zu untersuchenden biotinylierten DNA-Oligonukleotide, MmMm, MmXx und als Referenz die XxXx-DNA, auf die Streptavidin Oberfläche des SA-Sensorchip immobilisiert (Sequenzen der DNAs siehe Tabelle 5.2). Nach Äquilibration des Chips mit Laufpuffer erfolgte die manuelle Beladung für jede Flusszelle einzeln bei einer geringen Flussrate bis zu einer Beladung von rund + 400 RU (*resonance units*) (Abbildung 5.11). Die Flusszelle FC1 wurde mit randomisierter DNA (XxXx, grünes Spektrum) als Referenz und zwei weitere FCs mit den zu analysierenden DNA-Oligonukleotiden (MmMm, rotes Spektrum; MmXx, blaues Spektrum) beladen (vgl. Abbildung 5.11).

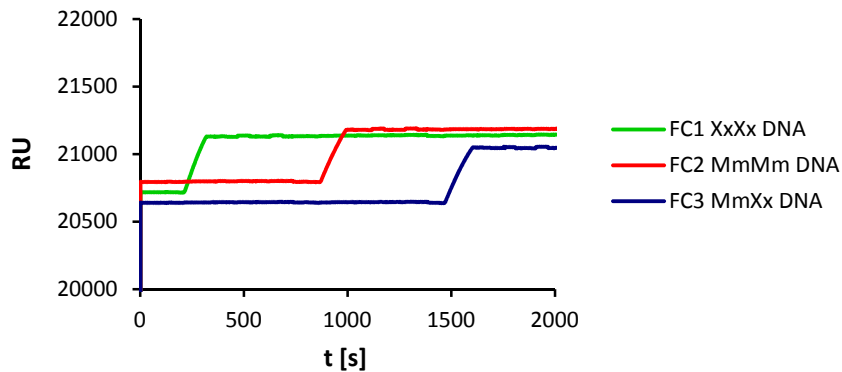


Abbildung 5.11: DNA-Immobilisierung auf einen SA-Sensorchip

Manuelle Immobilisierung biotinylierter DNA auf einen SA-Sensorchip über Streptavidin-Biotin- Interaktion. Zu sehen ist die Veränderung der Resonanzeinheiten (RU) im Verlauf der Injektion der einzelnen DNAs auf den Flusszellen (FC). Zuerst wurde die XxXx-DNA (grün), anschließend die MmMm-DNA (rot) und als letztes die MmXx-DNA (blau) immobilisiert. Es wurden jeweils ca. + 400 RU der entsprechenden DNA auf die Flusszellen appliziert.

5.4.2. Messung der PhoB^{DBD}-DNA-Interaktionen mittels SPR

Um die Spezifität und Affinität der Protein-DNA-Interaktion zu quantifizieren, wurden Protein-Verdünnungsreihen eingesetzt und die Interaktion mit den immobilisierten DNA-Oligonukleotiden analysiert. Die im Folgenden dargestellten Differenzsensogramme zeigen den Verlauf der Interaktionen der einzelnen Proteine mit der jeweiligen DNA nach Subtraktion des entsprechenden Referenzspektrums der randomisierten DNA (XxXx). Abbildung 5.12 A zeigt die Sensogramme der konzentrationsabhängigen Interaktion des PhoB^{DBD}-WT-Proteins mit den zwei vollständigen Bindestellen der MmMm-DNA in Doppelbestimmung. Das Farbschema richtet sich nach den gemessenen Proteinkonzentrationen von 0,5 μM (hellgrün) bis zu 20 μM (schwarz, siehe Legende Abbildung 5.12). Nach einer stabilen Basislinie zeigen zu Beginn der Injektion bei 180 s alle gemessenen Proteinkonzentrationen einen sehr steilen Anstieg des Signals, welches auf eine sehr schnelle Assoziation der Proteine deutet. Bei Erreichen eines Gleichgewichts der Komplexbildung zeigt der Kurvenverlauf ein stabiles Plateau. Nach Beendigung der Injektion des PhoB^{DBD}-WT-Proteins bei 300 s erfolgt eine rapide Abnahme der Signale aufgrund einer schnellen Dissoziation. Die sich überlagernden Kurvenverläufe der Doppelbestimmung zeigen eine gute Reproduzierbarkeit der gemessenen Signale (vgl. Abbildung 5.12 A, gleiches Farbschema für Messungen der gleichen Konzentration).

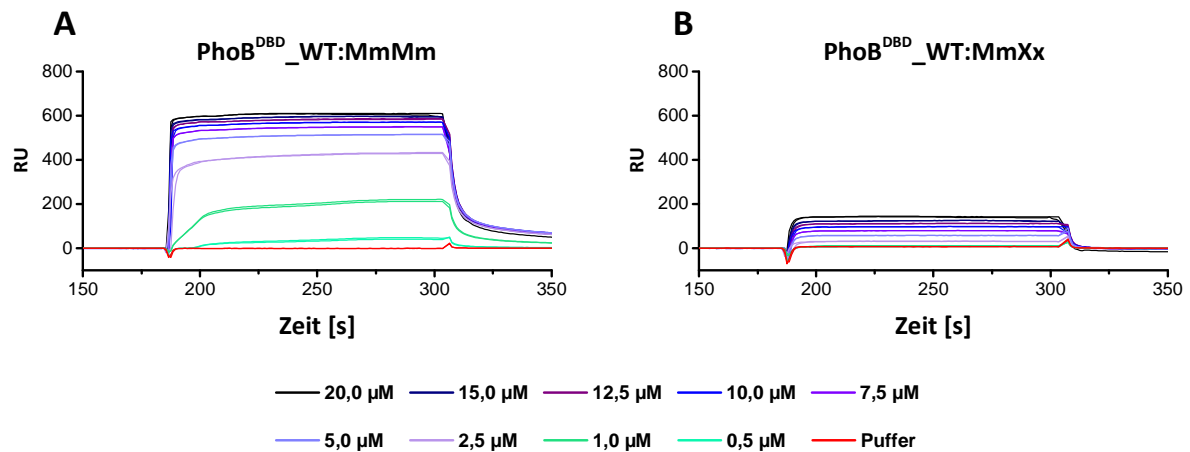


Abbildung 5.12: SPR-Sensogramme der Interaktion des PhoB^{DBD}-Wildtyp Proteins mit der *pho box*-DNA

Echtzeitanalyse der Wechselwirkungen des PhoB^{DBD}_WT-Proteins mit der MmMm-DNA (A) mit zwei vollständigen Bindestellen und der MmXx-DNA (B) mit einer Bindestelle. Gezeigt sind in Doppelbestimmung gemessene Differenzsensogramme. Die vermessenen Konzentrationen der Proteine sind der Legende zu entnehmen.

Zusätzlich zur MmMm-DNA wurde die MmXx-DNA, mit nur einer vollständigen Bindestelle, per SPR im Hinblick auf die Interaktion mit dem PhoB^{DBD}_WT-Protein vermessen. Wie in Abbildung 5.12 B dargestellt, zeigt das Differenzsensogramm eine mit der MmMm-DNA-Interaktion vergleichbare schnelle Assoziation und Dissoziation. Auffallend ist jedoch, dass die RU-Werte im Gleichgewicht der MmXx-DNA (20 µM, ~ 140 RU) im Vergleich zur MmMm-DNA (20 µM, ~ 600 RU) deutlich verringert sind. Da die MmMm-DNA zwei vollständige Bindestellen mit TGTCA-Motiv und A/T-reicher Sequenz besitzt und die MmXx-DNA dagegen nur eine Bindestelle, resultieren die höheren RU-Werte der MmMm-DNA durch die Bindung einer höheren Anzahl an Proteinen an die zwei Bindestellen.

Insgesamt zeigt die Interaktionsanalyse des PhoB^{DBD}-Wildtyp Proteins sowohl mit der *pho box*-DNA mit zwei vollständigen Bindestellen als auch mit einer Bindestelle eine starke Assoziation und schnelle Dissoziation, was auf eine schnelle und effiziente DNA-Bindung der Proteine hindeutet.

Zur Überprüfung der Spezifität der DNA-Bindung durch die PhoB^{DBD}-Proteine wurde die PhoB^{DBD}_R203A Mutante als Negativkontrolle eingesetzt. Abbildung 5.13 A zeigt das Differenzsensogramm der Interaktion von PhoB^{DBD}_R203A mit der MmMm-DNA. Selbst bei der höchsten Proteinkonzentration von 20 μ M (schwarz) konnte keine Interaktion mit der *pho box*-DNA nachgewiesen werden. Das gleiche Resultat lieferte die Messung der Mutante mit der MmXx-DNA (vgl. Abbildung 5.13 B). Somit konnten die CD-Ergebnisse in Hinblick der essentiellen Wechselwirkung der Aminosäure Arg203 mit der *pho box*-DNA bestätigt werden (vgl. 5.3.2). Durch den Austausch der Aminosäure zu Alanin wurde die DNA-Bindung vollständig aufgehoben.

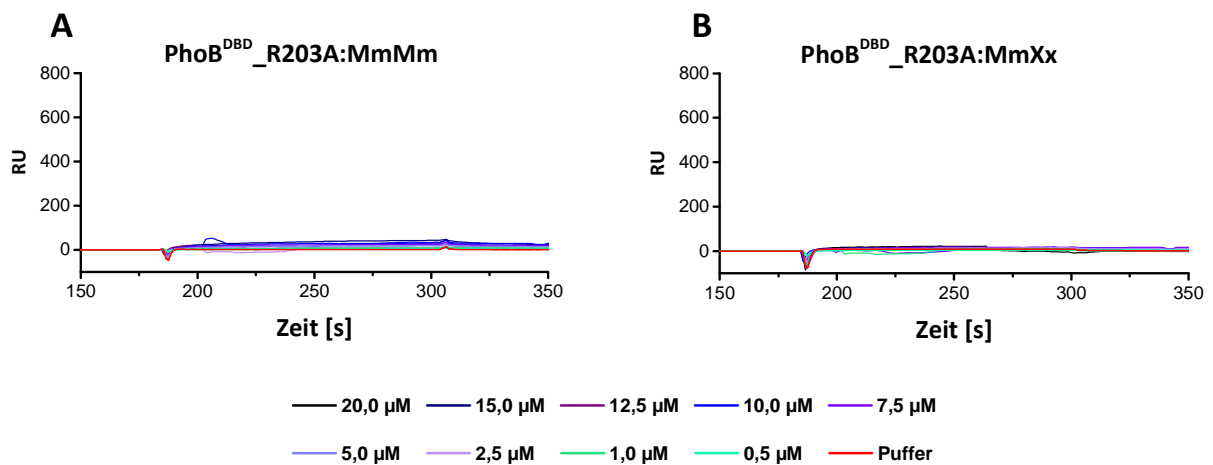


Abbildung 5.13: SPR-Sensogramme der Interaktion der Mutante PhoB^{DBD}_R203A mit *pho box*-DNA

Echtzeitanalyse der Wechselwirkungen der PhoB^{DBD}_R203A Mutante mit der MmMm-DNA (A) mit zwei vollständigen Bindestellen und der MmXx-DNA (B) mit einer Bindestelle. Gezeigt sind in Doppelbestimmung gemessene Differenzsensogramme. Die vermessenen Konzentrationen der Proteine sind der Legende zu entnehmen.

Des Weiteren wurde die DNA-Bindung der mutierten PhoB^{DBD}-Proteine untersucht. Dadurch sollten die Beiträge einzelner Aminosäureseitenketten an der Interaktion mit der *pho box*-DNA bestimmt werden. Die CD-Analysen bestätigten, dass sich die Proteine in ihrer Konformation kaum voneinander unterscheiden und so eine veränderte Interaktion mit der DNA auf der Deletion der Wechselwirkung der entsprechenden Aminosäureseitenkette basiert (vgl. 5.3.2). Abbildung 5.14 zeigt exemplarisch für die PhoB^{DBD}-Mutanten die Interaktion von PhoB^{DBD}_E191A mit der MmMm- (A) und MmXx-DNA (B). Hier belegen die Differenzsensogramme eindeutig eine Interaktion des Proteins mit beiden DNA-Oligonukleotiden. Es wurden Konzentrationsreihen von 0,5 μ M (hellgrün) bis 40 μ M (schwarz) in Doppelbestimmung vermessen. Bezogen auf die maximalen RU-Werte der Interaktion im Gleichgewicht bei 20 μ M binden mehr Proteine an die MmMm-DNA

(~ 650 RU) mit zwei Bindestellen, als an die MmXx-DNA (~ 300 RU) mit nur einer Bindestelle für das PhoB^{DBD}-Protein.

Im Vergleich mit dem Wildtyp Protein zeigen die Sensogramme insgesamt einen übereinstimmenden Verlauf und annähernd gleiche maximale RU-Werte im Gleichgewicht. Auch die Differenzsensogramme dieser Mutante sind durch eine starke Assoziation und schnelle Dissoziation geprägt.

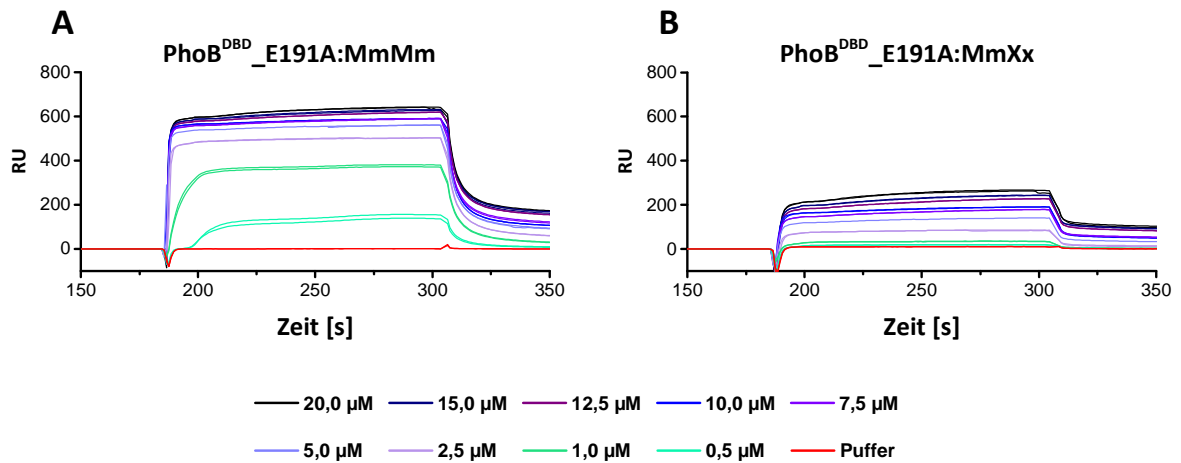


Abbildung 5.14: SPR-Sensogramme der Interaktion der Mutante PhoB^{DBD}_E191A mit *pho box*-DNA

Echtzeitanalyse der Wechselwirkungen der PhoB^{DBD}_E191A Mutante mit der MmMm-DNA (A) mit zwei vollständigen Bindestellen und der MmXx-DNA (B) mit einer Bindestelle. Gezeigt sind die in Doppelbestimmung gemessenen Differenzsensogramme. Die vermessenen Konzentrationen der Proteine sind der Legende zu entnehmen.

Die weiteren PhoB^{DBD}-Mutanten wurden ebenfalls mittels SPR-Spektroskopie vermessen. Zur besseren Übersicht sind die entsprechenden Differenzsensogramme im Anhang dargestellt (Abbildung 8.2). Die Kurvenverläufe unterschieden sich teilweise in der Höhe der RU-Werte im Gleichgewicht, zeigen aber ebenfalls den prominenten schnellen Anstieg der Assoziationsphase und den rapiden Abnahme des Signals in der Dissoziationsphase und damit eine eindeutige Bindung an beide DNA-Oligonukleotide.

Dementsprechend konnten die Ergebnisse der CD-Interaktionsexperimente bestätigt werden, dass die DNA-Bindung durch den Verlust der Interaktionen der einzelnen Aminosäureseitenketten nicht vollständig aufgehoben wird.

5.4.3. Quantitative Bestimmung der DNA-Interaktion der PhoB^{DBD}-Proteine

Im Vergleich zu den CD-Untersuchungen erlaubt Interaktionsanalyse durch SPR ein differenzierteres Bild der Interaktionen. Durch die Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D) konnten die Affinitäten der Protein-DNA-Interaktionen genauer beschrieben und die Stabilität der verschiedenen PhoB^{DBD}-DNA-Komplexe miteinander verglichen werden.

5.4.3.1. Berechnungen der K_D -Werte der Interaktion von PhoB^{DBD}-Proteinen mit der MmMm-DNA

Obwohl die MmMm-DNA zwei Bindestellen für das PhoB-Protein besitzt, führten Berechnungen mit einem 1:2 Bindemodell nicht zu verlässlichen Ergebnissen. Dies ist durch die sehr schnelle Assoziation und Dissoziation von PhoB^{DBD} begründet, woraus der beobachtete schnelle Anstieg und die rapide Abnahme der RU-Signale resultierte. Aufgrund dessen konnte nicht zwischen K_{D1} und K_{D2} für zwei Bindestellen differenziert werden (vgl. 4.5.3). Dementsprechend wurden die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der Interaktion der PhoB^{DBD}-Proteine mit der MmMm-DNA mit Hilfe eines 1:1-Bindemodells berechnet. Die Legitimation der Verwendung des 1:1-Bindemodells dieses Berechnungsverfahrens wurde durch Studien zur Aufklärung des Bindemechanismus von PhoB^{DBD} an die *pho box*-DNA durch Herrn Dr. Markus Ritzefeld nachgewiesen. Diese Untersuchungen zeigten, dass ein kooperativer Bindemechanismus vorliegt, aufgrund dessen auch bei geringen Proteinkonzentrationen ein heterotrimerer Komplex vorliegt. Dieser besteht aus der *pho box*-DNA und zwei PhoB^{DBD}-Proteinen und wird durch intensive Protein-Protein-Wechselwirkungen der beiden PhoB^{DBD}-Proteine stabilisiert. Daher zeigte sich ein 1:1-Bindemodell unter Berücksichtigung der Kooperativität durch Berechnung des Hill-Koeffizienten zur Analyse der Interaktion von PhoB^{DBD} mit der *pho box*-DNA als geeignet. ^[136] In dieser Arbeit wurde die Kooperativität der beiden Bindestellen ebenfalls durch Berechnung des Hill-Koeffizienten verifiziert. Die Ergebnisse dazu werden im Abschnitt 5.4.3.2 separat dargestellt.

Zur Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten wurde die RU im Gleichgewicht gegen die jeweilige Konzentration des PhoB^{DBD}-Proteins aufgetragen (Abbildung 5.15) und aus der erhaltenen Sättigungskurve die K_D -Werte unter Verwendung des 1:1-Bindemodells durch nichtlineare Regression mittels der Gleichung (4-9) berechnet (Tabelle 5.4).

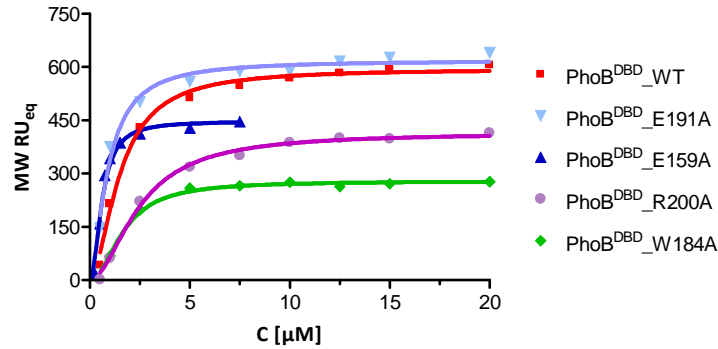


Abbildung 5.15: Sättigungskurven zur Berechnung der K_D -Werte der Interaktionen mit MmMm-DNA

Durch Auftragen der RU im Gleichgewicht ($MW\ RU_{eq}$) gegen die jeweilige Analytkonzentration ($C\ [\mu M]$) wurden Sättigungskurven erstellt. Dargestellt sind die Interaktionen der vermessenen PhoB^{DBD}-Proteine mit der MmMm-DNA.

Tabelle 5.4: SPR-Ergebnisse der Interaktionen von PhoB^{DBD}-Proteinen mit MmMm-DNA

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D) wurden unter Verwendung eines 1:1-Bindemodells durch nichtlineare Regression berechnet. (KI = 95 % Konfidenzintervall, R^2 = Bestimmtheitsmaß)

MmMm:PhoB ^{DBD}	$K_D\ [\mu M]$	KI [μM]	R^2
PhoB ^{DBD} _WT	1,5	1,2 - 1,8	0,99
PhoB ^{DBD} _E159A	0,6	0,5 - 0,7	0,99
PhoB ^{DBD} _W184A	1,7	1,4 - 2,0	0,99
PhoB ^{DBD} _E191A	1,0	0,8 - 1,2	0,98
PhoB ^{DBD} _R200A	2,5	2,2 - 2,8	0,99
PhoB ^{DBD} _R203A	-	-	-

Der PhoB^{DBD}-Wildtyp ist durch einen K_D -Wert von 1,5 μM für die Interaktion mit der MmMm-DNA charakterisiert. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit dem von Herrn Dr. Markus Ritzefeld nachgewiesenen Wert von 1,4 μM . [22]

Diese K_D -Werte sind mit der Gleichgewichtskonstante vergleichbar, die für den Komplex bestehend aus PhoB^{DBD}_W184A und der MmMm-DNA gemessen wurde (1,7 μM). Laut den Ergebnissen der Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie bildet die terminale Aminosäure der α^3 -Helix Tryptophan Trp184 des Wildtyp-Proteins eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Phosphatrest des T3-Thymins der großen Furche der *pho box*-DNA aus (vgl. Abbildung 5.1). [3] Durch die Mutation von Trp184 zu Alanin kann diese Interaktion nicht mehr ausgebildet werden. Der Verlust dieser einzelnen Interaktion der Mutante PhoB^{DBD}_W184A hat laut SPR-Ergebnis keine Auswirkungen auf die Affinität der DNA-Bindung.

Die Mutante PhoB^{DBD}_R200A zeigt im Komplex mit der MmMm-DNA einen um Faktor 1,7 erhöhten K_D -Wert von 2,5 μM im Vergleich mit der Interaktion des Wildtyps (1,5 μM). Dies bedeutet eine leicht verringerte Affinität der DNA-Bindung. Eine mögliche Ursache ist, dass die Mutation von Arginin Arg200 zu einem Verlust von drei Interaktionen des PhoB^{DBD}-Proteins mit der *pho box*-DNA führt. Diesbezüglich bildet Arg200, den Ergebnissen der Strukturanalyse gemäß, zwei Wasserstoffbrückenbindungen unter Beteiligung von Wassermolekülen mit den Phosphatgruppen des T6'-Thymins und G7'-Guanins und eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung mit dem Phosphatrest des T6'-Thymins der großen Furche aus (vgl. Abbildung 5.1). [3]

Einen leicht reduzierten K_D -Wert weist die Mutante PhoB^{DBD}_E191A (1,0 μM) im Vergleich mit dem Wildtyp (1,5 μM) auf. Zwar bildet Glutaminsäure Glu191 eine Wasserstoffbrückenbindung zum Phosphatrest des G4-Guanins der großen Furche aus, aber diese Interaktion findet nicht durch die Seitenkette der Aminosäure statt. [20] Da die Aminosäure unter physiologischen Bedingungen eine negative Ladung aufweist und laut Kristallstruktur die Carbonsäure-Funktion nah am negativen Phosphatrückgrat der DNA lokalisiert ist, könnte eine Mutation zu Alanin zu einem Verlust dieser repulsiven Wechselwirkung führen (vgl. Abbildung 5.16). Dies könnte sich in einer geringfügig erhöhten Bindungsaffinität ausdrücken, auf welche die SPR-Ergebnisse hindeuten.

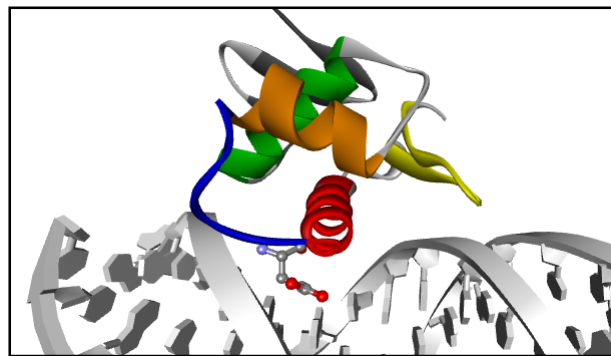


Abbildung 5.16: Lokalisation von Glutaminsäure Glu191 im PhoB^{DBD}-DNA-Komplex

Die Glutaminsäure 191 befindet sich am C-terminalen Ende des *loops* (blau) zwischen der α^2 - und α^3 -Helix. Die Carbonsäurefunktion der Aminosäure ist in Richtung des Phosphatrückgrats der großen Furche der *pho box*-DNA lokalisiert. (PDB-Datenbank: 1GXP.pdb)

Auffallend ist Bindungsfähigkeit der Mutante PhoB^{DBD}_E159A mit einem deutlich reduzierten K_D -Wert, der um den Faktor 2,5 zum Wildtyp abweicht. Auch unter Berücksichtigung des Konfidenzintervalls wird deutlich, dass die Mutante PhoB^{DBD}_E159A eine signifikant höhere Affinität zu der MmMm-DNA im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein aufweist. Im Kontext der Strukturaufklärung des PhoB^{DBD}-DNA-Komplexes interagiert die

Seitenkette der Glutaminsäure Glu159 über zwei durch Wassermoleküle medierte Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Phosphatrest des ersten Thymins (T3) der TGTCA-Sequenz der großen Furche (vgl. Abbildung 5.1).^[3] Darüber hinaus wechselwirkt Glu159 intramolekular mit Histidin His198, wodurch die Aminosäureseitenketten der α^1 - und α^3 -Helix des PhoB-Proteins miteinander interagieren.^[20]

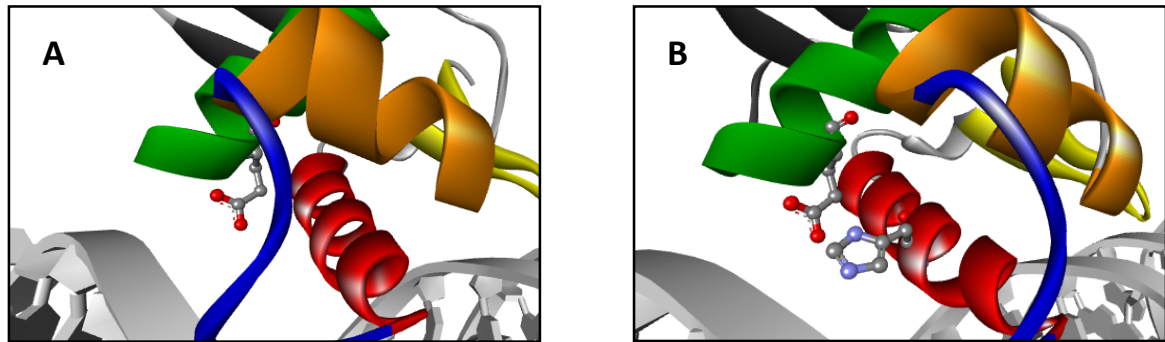


Abbildung 5.17: Lokalisation von Glutaminsäure Glu159 im PhoB^{DBD}-DNA-Komplex

Die Glutaminsäure 159 der α^1 -Helix interagiert mit dem Phosphatrückgrat der *pho box*-DNA (A). Zusätzlich bildet sie eine intramolekulare Wechselwirkung mit Histidin 198 der α^3 -Helix aus (B). (PDB-Datenbank: 1GXP.pdb)

Abbildung 5.17 veranschaulicht die Lokalisation der Seitenkette von Glu159 in Bezug auf die Interaktion mit der DNA (A) und auf die intramolekulare Wechselwirkung (B). In diesem Zusammenhang wird Glu159 als eine hochkonservierte Aminosäure in der Familie der OmpR-PhoB Transkriptionsregulatoren beschrieben. Glu159 und weitere hochkonservierte Aminosäuren bilden intramolekulare Interaktionen zwischen verschiedenen Regionen des Transkriptionsfaktors aus. Durch die Wechselwirkungen verschiedener Sekundärstrukturelemente untereinander wird eine bestimmte räumliche Anordnung der Sekundärstrukturen erreicht. Dadurch werden die Orientierung und Distanzen aufrechterhalten, die für eine DNA-Bindung benötigt werden.^[20]

Ein Beispiel einer weiteren konservierten Aminosäure ist das Arginin Arg203 der α^3 -Helix, welches zusätzlich zu den zwei Interaktionen mit der DNA, zwei intramolekulare Wechselwirkungen mit dem β -hairpin über die ebenfalls konservierten Aminosäuren Threonin Thr217 und Valin Val218 eingeht.^[20] Wie bereits beschrieben, sind die Interaktionen des Arginin 203 essentiell für die DNA-Bindung.^[133] Ritzefeld et al. konnten in SPR-Interaktionsstudien mit der *pho box*-DNA zeigen, dass die Mutanten PhoB^{DBD}_T217A und PhoB^{DBD}_V218A eine verringerte Affinität aufweisen.^[136] Beide Aminosäuren interagieren intramolekular mit Arg203 und adressieren die kleine Furche der *pho box*-DNA.^[3,20] Weitere Mutanten wie

PhoB^{DBD}_Y223A, deren korrespondierende Aminosäure die Interaktionen zur kleinen Furche und intramolekulare Wechselwirkungen zu Arginin Arg176 und Asparagin Asn196 aufweist, zeigte eine komplette Aufhebung der DNA-Bindung in den von Ritzefeld et al. durchgeführten SPR-Experimenten. Auch für die Alanin-Punktmutanten der beiden letzteren Aminosäuren wurde keine DNA-Bindung festgestellt. [22,136]

Die Interaktionsanalysen der genannten, bereits charakterisierten Mutanten weisen darauf hin, dass durch den Verlust der Interaktion mit der kleinen Furche und/ oder intramolekularer Wechselwirkungen, die *pho box*-DNA nicht mehr gebunden wird oder die Affinität zur DNA signifikant reduziert ist.

Obwohl bei der Mutation der Aminosäure Glu159 laut Kristallstruktur und NMR-Untersuchungen zwei Beiträge zur DNA-Bindung der großen Furche und zusätzlich eine intramolekulare Wechselwirkung deletiert wurden, ist die Affinität zu der MmMm-DNA in Bezug auf die SPR-Ergebnisse signifikant erhöht. Zudem führt der Verlust der intramolekularen Wechselwirkung mit His198 zu einer verringerten konformationellen Stabilität des Proteins, welche durch die geringe Denaturierungstemperatur im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein belegt wurde (vgl. 5.3.4).

Die einzige andere, bisher untersuchte Mutante, die in SPR-Interaktionsstudien mit einer *pho box*-basierten DNA charakterisiert wurde und ebenfalls eine höhere Affinität aufwies, ist die Mutante PhoB^{DBD}_H198A. [135] Die korrespondierende Aminosäure His198 interagiert über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Phosphatrest desselben T3-Thymins der großen Furche, mit dem auch Glu159 interagiert. Darüber hinaus wechselwirken diese beiden Aminosäuren, wie beschrieben, intramolekular miteinander. Eine Aussage darüber, ob die geringeren K_D -Werte aus dem Verlust der DNA-Interaktion oder der intramolekularen Wechselwirkung resultiert, ist ohne weiterführende Untersuchungen nicht möglich. Zu diesem Zweck könnten die Interaktionen mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie untersucht werden. Durch AFM-DFS-Messungen (*atomic force microscopy – dynamic force microscopy*) können Interaktionen auf Einzelmolekülniveau quantifiziert werden. Diese erlauben Aussagen zur Stabilität der Protein-DNA-Komplexe durch Analysen der Bindungskraft, Dissoziationskonstanten und Lebensdauer der Komplexe. AFM-DFS-Untersuchungen zur Stabilität des Protein-DNA-Komplexes der Mutante PhoB^{DBD}_H198A durch Wollschläger et al. machten deutlich, dass diese eine verringerte Lebenszeit und somit eine geringere Stabilität des Komplexes im Vergleich zum Wildtyp-Protein aufweist. [133] Aufgrund dieses Ergebnisses sollte auch die Mutante PhoB^{DBD}_E159A mit dieser Technik untersucht werden. Interessant wäre dabei, ob die Mutante in Hinsicht auf die Komplexstabilität mit PhoB^{DBD}_H198A vergleichbare Ergebnisse liefert und somit trotz erhöhter Affinität zur DNA ebenfalls eine geringere Komplexstabilität aufweist.

Ferner könnte der Hinweis, ob eine verringerte Stabilität des PhoB^{DBD}-Proteins, explizit ein erhöhter Freiheitsgrad der α^1 - zur α^3 -Helix, zu einer erhöhten Affinität der DNA-Bindung führen kann, durch Charakterisierung geeigneter Mutanten weiter untersucht werden. Als Kandidaten eignen sich die Aminosäuren Leucin Leu163 der α^1 -Helix und Leucin Leu202 der α^3 -Helix. Diese bilden intramolekulare Wechselwirkungen miteinander aus und stabilisieren dadurch die Orientierung der gleichen Sekundärstrukturelemente wie Glu159 und His198. Weder Leu163 noch Leu202 sind aber laut Kristallstrukturanalyse in der DNA-Bindung durch entsprechende Interaktionen involviert. [20] Unterschiede in der Affinität und der Denaturierungstemperatur dieser Kandidaten könnten aufgrund der fehlenden Interaktion mit der DNA, ein differenzierteres Bild der Beiträge von DNA-Interaktion und intramolekularer Wechselwirkung auf die DNA-Bindung liefern.

5.4.3.2. Bestimmung der Kooperativität des Bindemechanismus durch Berechnung des Hill-Koeffizienten

Bei der Bindung von PhoB^{DBD}-Proteinen an die MmMm-DNA entsteht ein heterotrimerer Komplex aus zwei PhoB^{DBD}-Proteinen und einem Oligonukleotid. Es konnte bereits in Interaktionsstudien mit den separierten Bindestellen durch Ritzefeld et al. gezeigt werden, dass beide Bindestellen gleiche Affinitäten für das PhoB^{DBD}-Protein aufweisen. [22] Darüber hinaus können generell zwei Bindestellen entweder unabhängig voneinander besetzt werden, oder die Affinität steigt oder sinkt mit zunehmender Proteinkonzentration. Wenn die Besetzung der beiden Bindestellen nicht einer linearen Funktion der Konzentration des Proteins folgt, zeigen die Bindestellen eine Kooperativität. [137] Dadurch, dass die MmMm-DNA nachweislich zwei Bindestellen besitzt, wurde dem Sachverhalt einer möglichen Kooperativität der Bindestellen durch Berechnung des Hill-Koeffizienten nachgegangen. Allgemein bedeutet ein Hill-Koeffizient größer 1 eine positive und ein Wert kleiner 1 eine negative Kooperativität. Im Fall einer unabhängigen Besetzung der Bindestellen beträgt der Wert 1,0. Im Fall einer positiven Kooperativität der zwei Bindestellen der MmMm-DNA beträgt der maximal erreichbare Wert 2,0. [130]

Die Hill-Koeffizienten wurden unter Verwendung eines 1:1-Bindemodells durch nichtlineare Regression mittels der Gleichung (4-9) simultan zu den K_D -Werten der MmMm-DNA berechnet (vgl. Tabelle 5.5). Der Hill-Koeffizient von 1,8 des PhoB^{DBD}_WT-Proteins weist darauf hin, dass die Besetzung der beiden Bindestellen mit einer hohen, positiven Kooperativität erfolgt. Im Vergleich mit dem Wildtyp zeigen fast alle Mutanten den maximalen Wert von 2,0 oder den identischen Wert zum Wildtyp von 1,8 auf. Nur die Mutante PhoB^{DBD}_E191A weist mit 1,4 einen niedrigeren Hill-Koeffizienten auf.

Die Hill-Koeffizienten der untersuchten Proteine zeigen somit, dass die Interaktionen eines positiv kooperativen Bindemechanismus folgen. Dies bedeutet, dass die Bindung des ersten Proteins die Affinität der Bindung des zweiten deutlich erhöht.

Tabelle 5.5: Hill-Koeffizienten der Interaktionen von PhoB^{DBD}-Proteinen mit der MmMm-DNA

Die Hill-Koeffizienten zur Bestimmung der Kooperativität der beiden Bindestellen wurden unter Verwendung eines 1:1-Bindemodells durch nichtlineare Regression bestimmt. (KI = 95 % Konfidenzintervall)

MmMm:PhoB ^{DBD}	Hill-Koeffizient	KI [μ M]
PhoB ^{DBD} _WT	1,8	1,4 - 2,0
PhoB ^{DBD} _E159A	2,0	1,3 - 2,0
PhoB ^{DBD} _W184A	2,0	1,5 - 2,0
PhoB ^{DBD} _E191A	1,4	0,9 - 1,8
PhoB ^{DBD} _R200A	1,8	1,5 - 2,0
PhoB ^{DBD} _R203A	-	-

In Bezug auf die berechneten Hill-Koeffizienten stehen die Resultate dieser Arbeit in guter Übereinstimmung mit der zuvor genannten Studie von Ritzefeld et al. zur Aufklärung des Bindemechanismus von PhoB^{DBD}, welche die positive Kooperativität beider Bindestellen der *pho box*-DNA bestätigt. [136]

5.4.3.3. Berechnungen der K_D -Werte der Interaktion von PhoB^{DBD}-Proteinen mit der MmXx-DNA

Wie bereits beschrieben, bindet das vollständige PhoB-Protein, bestehend aus einer regulatorische Domäne (RD) und einer DNA-bindenden Domäne (DBD) nach Aktivierung als Dimer an die *pho box*-DNA, die zwei komplette Bindestellen aufweist. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide weisen im Fall der MmMm-DNA zwei und im Fall der MmXx-DNA eine komplette Protein-Bindestellen auf. Durch einen Vergleich der K_D -Werte der MmMm- mit der MmXx-DNA können daher Rückschlüsse auf den Beitrag einer möglichen Wechselwirkung der beiden PhoB^{DBD}-Proteine miteinander gezogen werden. Die SPR-Analyse der Interaktion der PhoB^{DBD}-Proteine mit der MmXx-DNA lieferte die in Abbildung 5.18 dargestellten Sättigungskurven. Die K_D -Werte wurden mittels nichtlinearer Regression mit Hilfe der Gleichung (4-10) unter Verwendung des 1:1 Bindemodells aus den Daten der Sättigungskurve berechnet und sind in der Tabelle 5.6 aufgeführt.

Der K_D -Wert von $19,3 \mu\text{M}$ für den PhoB^{DBD}-Wildtyp in Komplex mit der MmXx-DNA stimmt gut mit dem von Herrn Dr. Markus Ritzefeld ermittelten Ergebnissen ($21,9 \mu\text{M}$, $KI = 10,3 - 33,4 \mu\text{M}$) überein. [22] Der K_D -Wert des Wildtyps von $19,3 \mu\text{M}$ ist im Vergleich zur Interaktion mit der MmMm-DNA ($1,5 \mu\text{M}$) um den Faktor 13 erhöht. Der geringere K_D -Wert der MmMm-DNA ist durch die positive Kooperativität der beiden Bindestellen begründet, welche durch die ermittelten Hill-Koeffizienten bestätigt wurde (vgl. 5.4.3.2). Des Weiteren wird der heterotrimere Komplex aus zwei PhoB^{DBD}-Proteinen und der MmMm-DNA durch intensive Protein-Protein-Wechselwirkungen der beiden gebundenen PhoB^{DBD}-Proteine stabilisiert. [136] Die positive Kooperativität und die stabilisierenden Protein-Protein-Wechselwirkungen entfallen bei der Bindung eines einzelnen Proteins an die MmXx-DNA. Dies führt zu einer geringeren Komplexstabilität und dadurch zu höheren K_D -Werten.

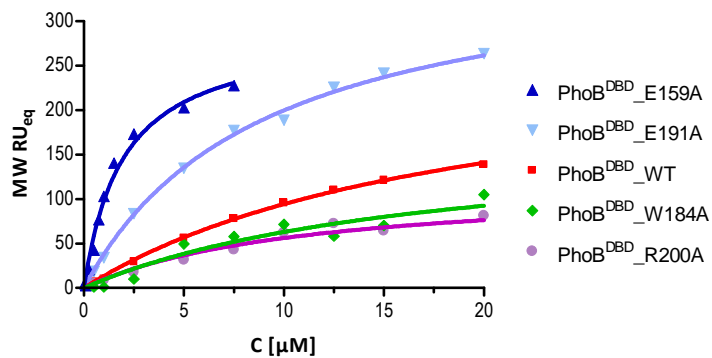


Abbildung 5.18: Sättigungskurven zur Berechnung der K_D -Werte der Interaktionen mit MmXx-DNA

Durch Auftragen der RU im Gleichgewicht (MW RU_{eq}) gegen die jeweilige Analytkonzentration ($C [\mu\text{M}]$) wurden Sättigungskurven erstellt. Dargestellt sind die Interaktionen der vermessenen PhoB^{DBD}-Proteine mit der MmXx-DNA.

Tabelle 5.6: SPR-Ergebnisse der Interaktionen von PhoB^{DBD}-Proteinen mit MmXx-DNA

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D) wurden unter Verwendung eines 1:1-Bindemodells durch nichtlineare Regression bestimmt. ($KI = 95 \%$ Konfidenzintervall, $R^2 = \text{Bestimmtheitsmaß}$)

MmXx:PhoB ^{DBD}	$K_D [\mu\text{M}]$	$KI [\mu\text{M}]$	R^2
PhoB ^{DBD} _WT	19,3	15,8 - 22,8	0,99
PhoB ^{DBD} _E159A	2,0	1,3 - 2,6	0,99
PhoB ^{DBD} _W184A	18,5	6,0 - 31,0	0,95
PhoB ^{DBD} _E191A	8,3	7,0 - 9,5	0,99
PhoB ^{DBD} _R200A	11,9	4,4 - 17,8	0,96
PhoB ^{DBD} _R203A	-	-	-

Diese Tendenz der höheren K_D -Werte bei Bindung an die MmXx-DNA im Vergleich zur MmMm-DNA ist für alle Mutanten zu beobachten (vgl. Tabelle 5.6). Unter Berücksichtigung der Konfidenzintervalle liegen die berechneten K_D -Werte für die Mutanten PhoB^{DBD}_W184A und PhoB^{DBD}_W184A mit 18,5 μ M und 11,9 μ M in der Größenordnung des Wildtyps und weisen auf eine vergleichbare Affinität hin. Aufgrund der fehlenden zweiten Bindestelle der MmXx-DNA sind die K_D -Werte im Vergleich mit der MmMm-DNA wie erwartet um den Faktor 11 für PhoB^{DBD}_W184A und um den Faktor 5 für PhoB^{DBD}_R200A für erhöht. In Bezug auf den Vergleich der Bindung an die MmXx-DNA zur MmMm-DNA stellte sich auch bei PhoB^{DBD}_E191A und PhoB^{DBD}_E159A eine Erhöhung der K_D -Werte um den Faktor 8 und Faktor 3 heraus. Diese Ergebnisse weisen auf eine verringerte Komplexstabilität bei der Interaktion der Mutanten mit der MmXx-DNA im Vergleich zur MmMm-DNA hin.

Interessanterweise zeigen die Mutanten PhoB^{DBD}_E159A und PhoB^{DBD}_E191A bei der Interaktionsanalyse mit der MmXx-DNA einen geringeren K_D von 2,0 μ M und 8,3 μ M im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Besonders deutlich ist die signifikante Reduktion des K_D -Wertes der Mutante PhoB^{DBD}_E159A um das Zehnfache. Diese erhöhte Affinität wurde ebenfalls für die Interaktion mit der MmMm-DNA nachgewiesen.

Die vergleichbaren Affinitäten der Mutanten PhoB^{DBD}_W184A und PhoB^{DBD}_R200A und die reduzierte Affinität von PhoB^{DBD}_E191A stehen in guter Übereinstimmung mit den SPR-Ergebnissen der Interaktionsanalyse mit der MmMm-DNA. Des Weiteren bestätigt sich die signifikante Reduktion der Affinität der Mutante PhoB^{DBD}_E159A für die MmMm-DNA auch für die MmXx-DNA. Mögliche Ursachen der teilweise abweichenden Affinitäten der Mutanten wurden bereits im Zusammenhang der einzelnen Interaktionen der korrespondierenden Aminosäureseitenketten im Kontext der Kristallstruktur für die MmMm-DNA beschrieben (vgl. 5.4.3.1). Diese können auch auf die Affinitäten zur MmXx-DNA bezogen werden, da keine der mutierten Aminosäureseitenketten an intermolekularen Protein-Protein-Wechselwirkungen involviert ist. [20]

5.4.3.4. Zusammenfassung der SPR-Ergebnisse

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der SPR-Messungen, dass alle charakterisierten Mutanten eine spezifische DNA-Interaktion mit der *pho box*-DNA aufweisen. Durch Berechnung der Dissoziationskonstanten konnten die Affinitäten der PhoB^{DBD}-Proteine zur *pho box*-DNA gegenübergestellt werden. Die Mutanten PhoB^{DBD}_W184A und PhoB^{DBD}_R200A weisen eine zum Wildtyp-Protein vergleichbare Affinität zur DNA auf. Die Mutanten PhoB^{DBD}_E159A und PhoB^{DBD}_E191A zeigen eine höhere Affinität zur DNA. Besonders PhoB^{DBD}_E159A kennzeichnet eine signifikante Reduktion der K_D -Werte im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein bei Analyse beider DNA-Oligonukleotide. Vor dem Hintergrund, dass bei der Mutation der Aminosäure Glu159 zwei Beiträge zur DNA-Bindung und zusätzlich eine intramolekulare Wechselwirkung deletiert wurden, ist diese erhöhte Affinität unerwartet. Ob die gesteigerte Affinität von PhoB^{DBD}_E159A zur *pho box*-DNA durch den Verlust der spezifischen DNA-Interaktion und/ oder der intramolekularen Wechselwirkung der korrespondierenden Aminosäureseitenkette impliziert wird, konnte nicht geklärt werden. Der Verlust der intramolekularen Wechselwirkung zwischen der α^1 - und α^3 -Helix des PhoB^{DBD}-Proteins führt allerdings zu einer verringerten konformationellen Stabilität, welche durch die verringerte Denaturierungstemperatur nachgewiesen werden konnte.

Ferner lieferte die Evaluation der SPR-Daten zur Interaktion von PhoB^{DBD} mit der MmMm-DNA nur unter Verwendung eines 1:1-Bindemodells verlässliche Ergebnisse, obwohl zwei Bindestellen für PhoB^{DBD} vorliegen. Dies liegt darin begründet, dass die Interaktion durch eine sehr schnelle Assoziation und Dissoziation von PhoB^{DBD} charakterisiert ist. Zudem erfolgt die Interaktion mit einem positiv kooperativen Bindemechanismus, aufgrund dessen auch bei geringen Proteinkonzentrationen ein heterotrimerer Komplex vorliegt. Die Kooperativität konnte durch Berechnung des Hill-Koeffizienten nachgewiesen werden. Bei der Interaktionsanalyse erreichten fast alle vermessenen Proteine Hill-Koeffizienten von annähernd 2,0. Dies ist der maximale Wert für zwei Bindestellen und somit liegt eine hohe positive Kooperativität der beiden Bindestellen vor. Die Bindung des ersten Proteins erhöht demzufolge die Affinität der Bindung des zweiten deutlich.

Durch den Vergleich der K_D -Werte der Interaktionsanalyse von MmMm- und MmXx-DNA konnte belegt werden, dass die PhoB^{DBD}-Proteine durch Protein-Protein-Wechselwirkungen zur Stabilität des Komplexes beitragen. Alle K_D -Werte der Interaktion der PhoB^{DBD}-Proteine mit der MmXx-DNA waren im Vergleich zur MmMm-DNA erhöht. Dies deutet erneut auf die hohe Kooperativität durch intensive Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der Besetzung der beiden Bindestellen der MmMm-DNA hin.

5.5. Sortase A-vermittelte Peptid-Ligation (SML)

Das Enzym Sortase A aus *Staphylococcus aureus* kann zur Ligation von Peptiden und Proteinen genutzt werden. In der Natur kommen Sortasen in Gram-positiven Bakterien vor, wo sie die Anheftung von Zelloberflächen-Proteinen, wie Virulenzfaktoren oder Pili-Strukturen, an die bakterielle Zellwand katalysieren. [33] Sortase A spaltet dabei spezifisch eine LPXTG-Aminosäuresequenz und bildet neue Amidbindungen mit Peptidoglykanen. [35,37] In dieser Arbeit wurde die Sortase A-vermittelte Transpeptidierung durch die Ligation von Peptiden in einem HPLC-basierten Assay etabliert.

5.5.1. Expression und Aufreinigung von SrtA_{Δ59}

In bereits beschriebenen Sortase A-vermittelten Ligationen wurden fast ausschließlich trunkierte, lösliche Formen der Sortase A eingesetzt, bei denen die N-terminale Membran-assoziierte Domäne deletiert wurde. Die Mutante SrtA_{Δ59} kann voll funktionsfähig und in hohen Ausbeuten *E. coli* rekombinant hergestellt werden. [49] Eine Aufreinigung des vollständigen Enzyms ist aufgrund der schlechten Löslichkeit durch die Membran-assoziierte Domäne erschwert. [138]

Das für die Expression der SrtA_{Δ59} benötigte Plasmid pSrtA_{Δ59} wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Ploegh (Withead Institute, Cambridge, USA) zur Verfügung gestellt. Eine Sequenzierung bestätigte die korrekte Sequenz des Plasmids, welches anschließend in kompetente *E. coli* ER2566 transformiert und zur Expression eingesetzt wurde. Abbildung 5.19 zeigt exemplarisch die Expression des SrtA_{Δ59}-Proteins, bei der stündlich Proben mittels SDS-PAGE analysiert wurden. In den Spuren 1 – 5 sind die Proben der Kultivierung über 5 h aufgetragen. In diesen Proben ist jeweils eine ausgeprägte Bande des Sortase-Proteins in Höhe von ~ 24 kDa zu sehen. Dies stimmt mit einer theoretischen Masse von 18,9 kDa nicht überein. In der SDS-PAGE zeigte die Sortase A generell eine scheinbar höhere Masse. Dieses Phänomen ist aus der Literatur, nicht nur für SrtA_{Δ59}, sondern auch für andere trunkierte Formen der Sortase A bekannt. [49,138,139] Keine dieser Publikationen lieferte allerdings eine Erklärung für das abweichende Laufverhalten des Enzyms. Die Aufreinigung des rekombinanten SrtA_{Δ59}-Proteins erfolgte nach dem Aufreinigungsprotokoll für His-tag Proteine mittels HisTalon-Affinitätschromatographie (siehe 4.3.2.2). Hierzu wurde das Zellysat nach Aufschluss der Zellen durch Schockfrieren auf eine Säule mit äquilibrierten HisTalon Beads gegeben. Die Histidine des Fusionsproteins bilden dabei einen Chelat-Komplex mit den Cobalt-Ionen des Säulenmaterials. Ungebundene Proteine und Verun-

reinigungen wurden durch Waschen von der Säule entfernt und das Zielprotein mittels hoher Imidazolkonzentration im Elutionspuffer eluiert (Puffer siehe 3.11.3). Abbildung 5.19 zeigt eine Probe des aufgereinigten Proteins (Spur 6). Die einzelne Bande in bei ~ 24 kDa belegt die hohe Reinheit des aufgereinigten SrtA $_{\Delta 59}$ -Proteins. Die Expression des SrtA $_{\Delta 59}$ -Proteins erbrachte Ausbeuten von bis zu 15 mg pro Liter Kulturvolumen. Diese Ausbeuten sind etwas geringer als Literaturangaben von ~ 20 mg/l für die Expression der Sortase-Mutante SrtA $_{\Delta 25}$.^[40]

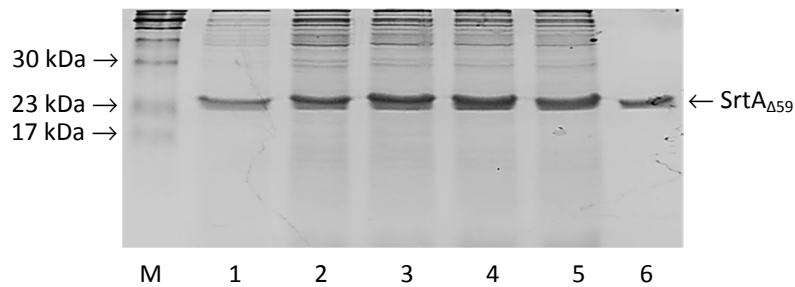


Abbildung 5.19: Expressionskontrolle des SrtA $_{\Delta 59}$ -Proteins mittels SDS-PAGE

Die Expression der SrtA $_{\Delta 59}$ wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die Spuren 1 bis 5 zeigen die Bildung des SrtA $_{\Delta 59}$ -Proteins über 5 h Kultivierung. In Spur 6 ist das aufgereinigte SrtA $_{\Delta 59}$ -Protein aufgetragen. 18 %iges SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie.

Die Analyse des SrtA $_{\Delta 59}$ -Proteins mittels MALDI-ToF-MS-Messung zeigte keine Übereinstimmung der Massen. Die detektierte Masse betrug $m/z = 19069$ (siehe Anhang, Abbildung 8.3). Im Vergleich zur theoretischen Masse von $m/z = 18892$ $[M+H]^+$ entspricht dies einer hohen Massendifferenz von $m/z = +177$. Es wurden in der Literatur auch bei anderen His-tag Proteinen Massenunterschiede von $m/z = +178$ beschrieben. Diese Massendifferenz kann durch eine α -N-Glukonoylierung des His-tags bei der Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* auftreten.^[140] Diese posttranslationale Modifikation des His-tag der Sortase A durch *E. coli* könnte eine Erklärung für den hier detektierten Massenunterschied liefern. Eine weitere Identifizierung des SrtA $_{\Delta 59}$ -Proteins erfolgte per *peptide mass fingerprinting* (PMF) (4.3.11.4). Dazu wurde eine Probe des Proteins tryptisch verdaut und per Massenspektrometrie analysiert. Der Vergleich der detektierten Massen mit den theoretischen Molekulargewichten der *in silico* geschnittenen Fragmente führte zu einer hohen Übereinstimmung für das SrtA $_{\Delta 59}$ -Protein (Abbildung 5.20). Dabei konnten 19 der detektierten Massen Fragmenten des Proteins zugeordnet und eine hohe Sequenzübereinstimmung von 85,7 % erreicht werden (Daten im Anhang, Tabelle 8.1). Auffallend an der Sequenzübereinstimmung ist, dass keine Masse des N-terminalen Fragmentes detektiert wurde. Dieser beinhaltet den His-tag, welcher laut MALDI-ToF-MS-Ergebnis posttranslational

modifiziert sein könnte. Dies weist erneut auf eine Massendifferenz durch posttranslationale Modifizierung hin.

MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MQAKPQIPKD KSKVAGYIEI PDADIKEPVY PGPATPEQLN
RGVSFAEENE SLDDQNISIA GHTFIDRPNY QFTNLKAAKK GSMVYFKVGN ETRYKMTSI
RDVKPTDVGV LDEQKGKDKQ LTLITCDDYN EKTGVWEKRR IFVATEVK

Abbildung 5.20: Sequenzübereinstimmung der SrtA_{Δ59} bei der PMF-Analyse nach tryptischem Verdau

Die bei der PMF-Analyse übereinstimmenden Aminosäuresequenzen der Sortase A sind unterstrichen dargestellt. Insgesamt wurde eine Sequenzübereinstimmung von 85,7 % erreicht.

Ferner wurde die Faltung des SrtA_{Δ59}-Proteins mittels CD überprüft (CD-Spektrum im Anhang, Abbildung 8.4). Anhand der aufgenommenen Spektren wurden die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente nach Chen und Yang berechnet. [120] Der Anteil an α -helikalen Strukturen der SrtA_{Δ59} lagt bei 7,5 % und der Anteil an β -Faltblättern bei 58 %. Basierend auf Ergebnissen der Kristallstrukturanalyse weist SrtA_{Δ59} 10 % helikale und 43 % Faltblätter auf (PDB: 1T2P). [43] Der hohe Anteil an β -Faltblättern, aufgrund der achtsträngigen β -Faßstruktur der Sortase A, konnte demnach bestätigt werden.

Das PMF-Ergebnis identifiziert das SrtA_{Δ59}-Protein eindeutig und die CD-Analyse belegte die erwartete Sekundärstruktur des Proteins. Somit konnte die Sortase A insgesamt erfolgreich dargestellt werden.

5.5.2. Festphasenpeptidsynthese von Peptiden als Substrate für die SrtA_{Δ59}-vermittelte Transpeptidierung

Bevor die Sortase A zur Cyclisierung des PhoB^{DBD}-Proteins eingesetzt wurde, wurde die SML mittels eines RP-HPLC-basierten Assays etabliert, die Aktivität des Enzyms überprüft und die Reaktionsbedingungen optimiert. Zu diesem Zweck wurden kurze Peptide synthetisiert, die in Testreaktionen eingesetzt wurden. Der Vorteil der kurzen Peptide liegt in ihrer Quantifizierbarkeit per RP-HPLC und in ihrer leichten Darstellung per automatisierter, mikrowellenunterstützter Festphasenpeptidsynthese.

5.5.2.1. Synthese des G₂HF-Peptids (1)

Die SPPS wurde in dieser Arbeit zur Synthese des G₂HF-Peptids (**1**) mit der Sequenz H-Gly-Gly-His-Phe-OH eingesetzt. Da dieses Peptid als Glycin-Nukleophil für die Sortase-vermittelte Transpeptidierung verwendet werden sollte, wurde eine kurze Sequenz mit zwei N-terminalen Glycinen ausgewählt (Sequenz siehe 4.3.9.2). Die Synthese erfolgte mittels automatisierter, mikrowellenunterstützter SPPS am 2-Chlortrityl-Harz unter Verwendung der Fmoc/tBu-Schutzgruppenstrategie (4.3.9). Das synthetisierte und aufgereinigte Peptid **1** zeigte in der analytischen RP-HPLC einen einzelnen Peak mit einer Retentionszeit von 3,8 min (Methode 3, 4.3.10). In der abschließenden MALDI-ToF-MS-Analyse ließen sich Signale von $m/z = 417,50$ und $m/z = 439,48$ den berechneten Massen von 417,18 [M + H]⁺ und 439,17 [M + Na]⁺ des G₂HF-Peptids (**1**) zuordnen. Insgesamt ist die Synthese des Peptids **1** erfolgreich und in guter Reinheit mit einer akzeptablen Ausbeute von 17,5 % (18,2 mg; 43,7 μmol) verlaufen.

5.5.2.2. Synthese des LPETG-Peptids (2)

Als weiteres Substrat für die Sortase-vermittelte Transpeptidierung wurde das Peptid **2** mit LPETG-Erkennungssequenz synthetisiert (Sequenz H-Ala-Gly-Leu-Pro-Glu-Thr-Gly-Glu-Glu-Asn-Pro-Phe-OH). Die Synthese des Peptids **2** erfolgte ebenfalls per SPPS durch Christian Bartz im Rahmen seiner Bachelorarbeit.^[112] Das Peptid **2** wurde per ESI-MS identifiziert und mit einer Ausbeute von 32 % (111 mg; 81 μmol) erfolgreich synthetisiert. Die Reinheit wurde per RP-HPLC durch einen einzelnen Peak bei einer Retentionszeit von 7,2 min belegt (Methode 3, 4.3.10).

5.5.3. Etablierung der SrtA_{Δ59}-vermittelten Transpeptidierung

Zur Etablierung der Sortase A-vermittelten Transpeptidierung wurde die Aktivität des Enzyms mit Hilfe der synthetisierten Peptide in einem RP-HPLC-basierten Assay getestet und die Produktbildung quantifiziert. Das zugrundeliegende Konzept der Testreaktionen ist in Abbildung 5.21 dargestellt. Die eingesetzten Peptide weisen im Fall des LPETG-Peptides (2) das Erkennungsmotiv und im Fall des G₂HF-Peptids (1) einen N-terminalen Diglycinrest auf, die als Substrate der Sortase A dienen. Als Produkte entstehen das ligierte Peptid 3 mit der Aminosäuresequenz H-Ala-Gly-Leu-Pro-Glu-Thr-Gly-Gly-His-Phe-OH und das eliminierte Peptidfragment 4 mit der Sequenz H-Gly-Glu-Glu-Asn-Pro-Phe-OH. In Abbildung 5.21 sind zusätzlich die jeweils theoretischen Massen der Peptide abgebildet.

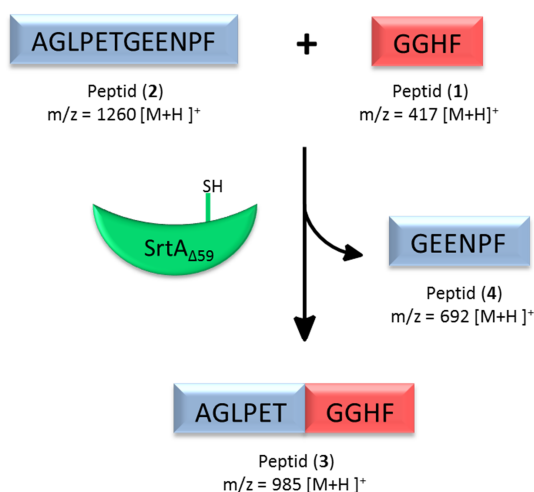


Abbildung 5.21: Konzept der SML-Testreaktion

Die in der Testreaktion zur Sortase A-vermittelten Ligation verwendeten Peptide weisen einerseits das LPETG-Erkennungsmotiv andererseits den N-terminalen Glycinrest als Nukleophil für die SML auf. Als Produkt entsteht das ligierte Peptid und als Nebenprodukt das abgespaltene Peptidfragment. Unter den jeweiligen Peptiden sind die berechneten Massen als $[M+H]^+$ aufgeführt.

Für die Reaktionskontrollen der in Tabelle 4.9 beschriebenen Testansätze wurden zusätzlich zum RP-HPLC-basierten Assay auch die Massen der einzelnen Peptide im Reaktionsgemisch mittels MALDI-ToF-MS und LC-MS überprüft. Die LC-MS-Daten gaben ferner auch Aufschluss über das Retentionsverhalten der Peptide im jeweiligen Reaktionsansatz.

Zunächst wurden aus der Literatur bekannte Parameter im Reaktionsansatz a getestet (vgl. Tabelle 4.9). In diesem wurden die Sortase A ($SrtA_{\Delta 59}$, 10 μM) und die Substrate (jeweils 100 μM) in BS-Puffer mit 5 μM Calciumchlorid und einer Inkubationszeit von 6 h bei 37 °C

eingesetzt. [83,97] Zum Vergleich des Retentionsverhaltens dienten Ansätze mit nur einem Peptid (**b** und **c**) und jeweils ohne Sortase A. Abbildung 5.22 zeigt die Chromatogramme der Ansätze **a**, **b** und **c**. Die unterste Spur (dunkelblau) zeigt die Peaks der Edukte und der Sortase in Reaktionsansatz **a** zu Beginn der Reaktion (0 h). Nach einer Inkubationszeit von 6 h weisen zwei zusätzliche Peaks in der obersten Spur (rot) auf die Bildung des Ligationsprodukts (**3**) ($t_R = 6,4$ min) und des eliminierten Peptids **4** ($t_R = 5,6$ min) hin. Über die Abnahme der Fläche des G_2HF -Peaks (**1**) wurde ein Umsatz von 39,8 % für die Testreaktion **a** nach 6 h Reaktionszeit berechnet (vgl. 4.6.1).

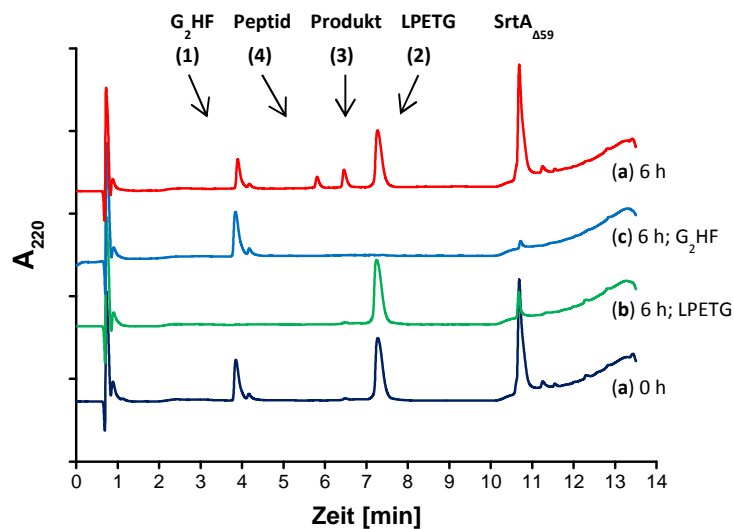


Abbildung 5.22: RP-HPLC-Chromatogramme des Reaktionsansatzes a

RP-HPLC-Chromatogramme des Reaktionsansatzes **a** nach 0 h und 6 h Inkubationszeit. Zum Vergleich der Retentionszeiten und -Verhalten wurden in Reaktionsansätzen ohne Enzym in **c** das G_2HF -Peptid (**1**) ($t_R = 3,8$ min) und in **b** das LPETG-Peptid (**2**) ($t_R = 7,2$ min) analysiert. Nach 6 h weisen zwei zusätzliche Peaks mit Retentionszeiten von 5,6 min und 6,4 min auf die Bildung des Peptids **4** und des Ligationsprodukts (**3**) hin.

Das Retentionsverhalten und die Zuordnung der einzelnen Peptide im Reaktionsansatz wurden durch LC-MS überprüft. Das LC-MS-Chromatogramm des Reaktionsansatzes **a** nach 6 h Inkubation ist in Abbildung 5.23 A dargestellt. Das Massenspektrum des ersten Peaks (3,5 min) lieferte eine Masse von $m/z = 493,33 [M+H]^{2+}$ und $m/z = 985,64 [M+H]^+$ für das ligierte Produktpeptid (**3**) mit einer theoretischen Masse von $m/z = 985,48 [M+H]^+$ (Abbildung 5.23 B). Das zweite Produkt **4** mit einer theoretischen Masse von $m/z = 692,29 [M+H]^+$ konnte dem zweiten Peak (3,7 min) im Chromatogramm zugeordnet werden (Abbildung 5.23 C). Die detektierten Massen aller Peptide sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

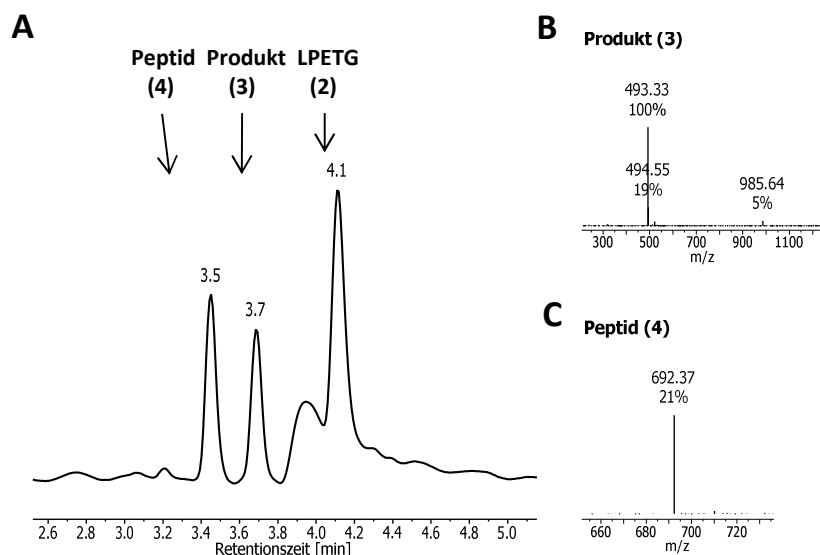


Abbildung 5.23: LC-MS-Analyse des Reaktionsansatzes a

A Chromatogramm des Reaktionsansatzes **a** nach 6 h Inkubation. **B** Der Peak bei 3,5 min konnte durch das Massenspektrum dieses Peaks dem ligierten Produktpeptid **3** zugeordnet werden. **C** Der Peak bei 3,7 min entspricht laut Massenspektrum dem Produktpeptid **4**.

Tabelle 5.7: Übersicht der theoretischen und detektierten Massen der LC-MS-Analyse der Testreaktion a nach 6 h Inkubation

Edukte	theor. [m/z]	detekt. [m/z]		Produkte	theor. [m/z]	detekt. [m/z]	
LPETG-Peptid (2)	1260,58	1260,87	[M+H] ⁺	Peptid (3)	985,48	985,33	[M+H] ⁺
	630,79	641,85	[M+H] ²⁺		493,24	493,33	[M+H] ²⁺
G ₂ HF-Peptid (1)	417,19	417,3	[M+H] ⁺	Peptid (4)	692,29	692,37	[M+H] ⁺
	209,10	-	[M+H] ²⁺		346,65	-	[M+H] ²⁺

Wegen der verschiedenen Säulen und Laufmittelgradienten der RP-HPLC-Messung der LC-MS-Analyse und der RP-HPLC des verwendeten Assays sind die Retentionszeiten des LC-MS-Chromatogramms abweichend zu denen des Assays. Grundsätzlich ist das Laufverhalten der Peptide bei beiden Methoden vergleichbar und demzufolge konnte die Zuordnung der Peptide im RP-HPLC-Assay bestätigt werden (vgl. Abbildung 5.22).

Ferner wurde die Produktbildung mittels MALDI-ToF-MS-Messung überprüft. Auch mit dieser Methode konnte die Produktbildung erneut durch den Vergleich der theoretischen mit den detektierten Massen belegt werden (vgl. Anhang, Abbildung 8.5 und Tabelle 8.2).

Insgesamt konnte die Ligation der Peptide **1** und **2** zu Peptid **3** bereits in den ersten Experimenten nachgewiesen und damit die Aktivität der SrtA_{Δ59} bestätigt werden.

5.5.3.1. Optimierung der Inkubationszeit der SML

In weiteren Experimenten wurde die Produktbildung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit quantifiziert. Zu diesem Zweck wurden die Produktumsätze des Reaktionsansatzes **d** zu verschiedenen Zeitpunkten durch RP-HPLC-Messungen ermittelt. In Abbildung 5.24 A sind die Chromatogramme des Testansatzes **d** der ersten 10 h und nach 24 h Inkubation gezeigt. Die prozentualen Anteile der Produktbildung in Abhängigkeit der Inkubationszeit sind in Abbildung 5.24 B dargestellt. Dabei war ein zeitabhängiger Anstieg des Umsatzes zu verzeichnen, der nach 24 h den höchsten Umsatz von 68,9 % zeigte. In der Literatur werden zur Peptid-Ligation durch Sortase A teilweise geringere Inkubationszeiten beschrieben, die einen Umsatz von 30 % nach 30 min oder 55 % nach 8 h aufweisen. [73,84]

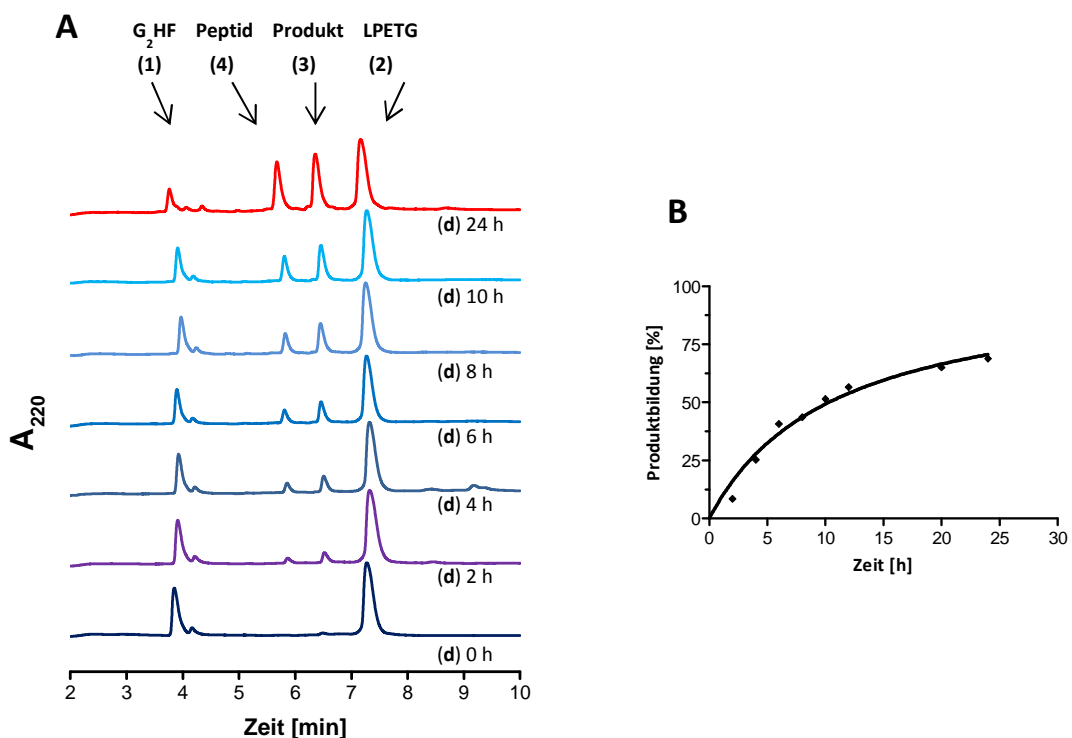


Abbildung 5.24: Zeitabhängiger Verlauf der Produktbildung des Reaktionsansatzes d durch SML

A RP-HPLC-Chromatogramme des Reaktionsansatzes **d** nach Inkubationszeiten von 0 – 24 h (siehe Legende). Das G₂HF-Peptid (1) und das LPETG-Peptid (2) eluieren nach 3,8 min und 7,3 min. Mit zunehmender Inkubationszeit weisen zwei zusätzliche Peaks mit Retentionszeiten von 5,6 min und 6,4 min auf die Bildung des Peptids 4 und des Ligrationsprodukts (3) hin. **B** Die prozentuale Produktbildung in Abhängigkeit der Inkubationszeit belegt eine zunehmende Bildung des Produktes 3 im Verlauf der Zeit mit einem maximalen Wert von 68,9 % nach 24 h.

Nach 24 h Inkubation wurde die Produktbildung des Ansatzes **d** durch Überprüfung der Massen per MALDI-ToF-MS bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Als Nebenreaktion zur Transpeptidierung durch Sortase A ist die Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates bekannt (vgl. Abbildung 5.25 A). Diese tritt besonders bei langen Inkubationszeiten auf. [42] Um eine mögliche Hydrolyse zu untersuchen, wurde in Reaktionsansatz **e** das LPETG-Peptid (**2**) zusammen mit der Sortase in Abwesenheit des Glycin-Nukleophils inkubiert. In Folge einer Hydrolyse entstehen durch die Spaltung des LPETG-Peptids (**2**) die Hydrolyseprodukte Peptid **5** und Peptid **4**. Letzteres entspricht auch dem eliminierten Transpeptidierungsprodukt (**4**).

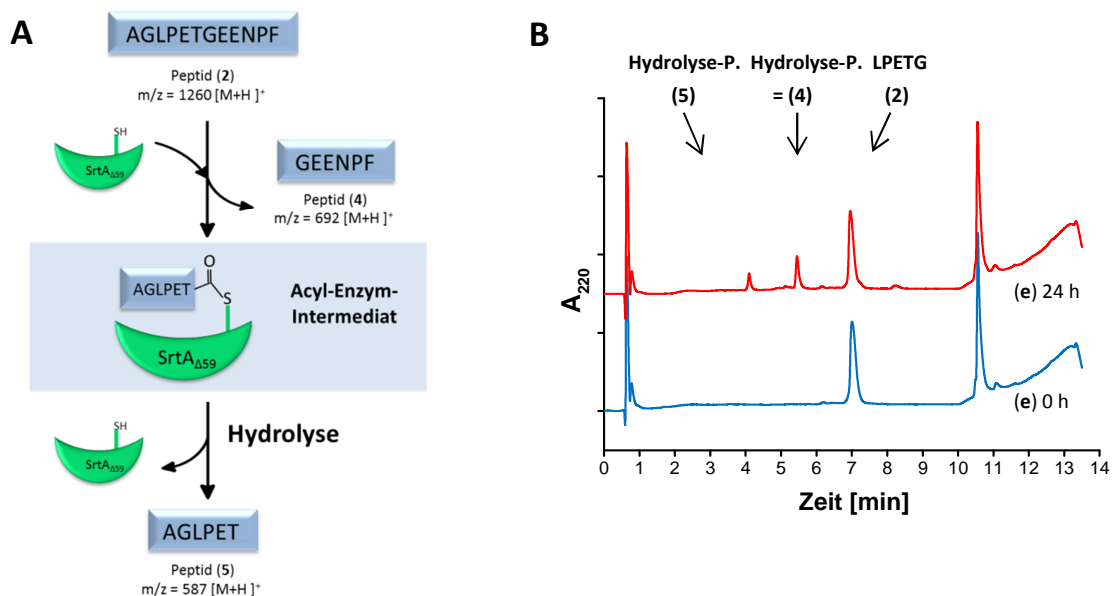


Abbildung 5.25: Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates (ohne Glycin-Nukleophil)

A Langzeit-Inkubation der Sortase-vermittelten Transpeptidierung führt teilweise zur Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates, dabei entstehen die Peptide **4** und **5**. **B** RP-HPLC-Chromatogramme des Ansatzes **e**, in dem das LPETG-Peptid (**2**) zusammen mit Sortase A für 24 h inkubiert wurde. Zwei zusätzliche Peaks ($t_R = 4,3$ und $5,6$ min) nach 24 h Inkubation (rot) im Vergleich zu 0 h Inkubation (blau), deuten auf eine Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates und Entstehung der Peptide **5** und **4** hin.

Abbildung 5.25 B zeigt die RP-HPLC-Chromatogramme des Reaktionsansatzes **e** nach 0 h und 24 h Inkubation. Die Spur ohne Inkubation (blau) belegt mit dem Peak bei 7,2 min das LPETG-Peptid (**2**). Nach 24 h Inkubation (rot) deuten zwei weitere Peaks bei 4,3 und 6,5 min auf die Hydrolyseprodukte **5** und **4** hin. Durch LC-MS-Analyse konnten die Hydrolyseprodukte verifiziert werden (vgl. Anhang, Abbildung 8.6).

Gemäß der Abnahme der integrierten Fläche des LPETG-Peptid-(**2**)-Peaks wurden 10,0 % des Peptids **2** in die Peptide **4** und **5** gespalten. Dies deutet darauf hin, dass unter den angewandten Parametern die Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates nicht im gleichen Maße wie die Transpeptidierungsreaktion ((**d**) 68,9 % Produkt) stattfindet. In der Literatur ist eine Bildung des Hydrolyseprodukts von weniger als 10 % beschrieben, die sich aber auf

wesentlich kürzere Reaktionszeiten und abweichende Konzentrationen der eingesetzten Reaktanden bezieht.^[84] Zur Untersuchung des Beitrages einer möglichen Hydrolyse während der Transpeptidierungsreaktion wurde der Reaktionsansatz **f**, mit beiden Peptidsubstraten (**1** + **2**) und Sortase, bis zu 48 h inkubiert (Abbildung 5.26). Die Chromatogramme zeigen eine Zunahme der Produkte (**3** und **4**) der Transpeptidierungsreaktion. Für das Hydrolyseprodukt (**5**) ist ein Peak mit der Retentionszeit von 4,3 min nach 48 h Inkubation zu erkennen (Abbildung 5.26 A). Das Peptid **3** ist ausschließlich ein Transpeptidierungsprodukt, wohingegen das Peptid **4** gleichzeitig ein Transpeptidierungs- und Hydrolyseprodukt ist. Die Peakfläche des Peptids **4** nimmt im Verhältnis zu Peptid **3** bei längerer Inkubation stärker zu (Abbildung 5.26 B). Dies weist auf einen steigenden Anteil der Hydrolysereaktion bei langen Inkubationszeiten hin, wie bereits in der Literatur beschrieben.^[42]

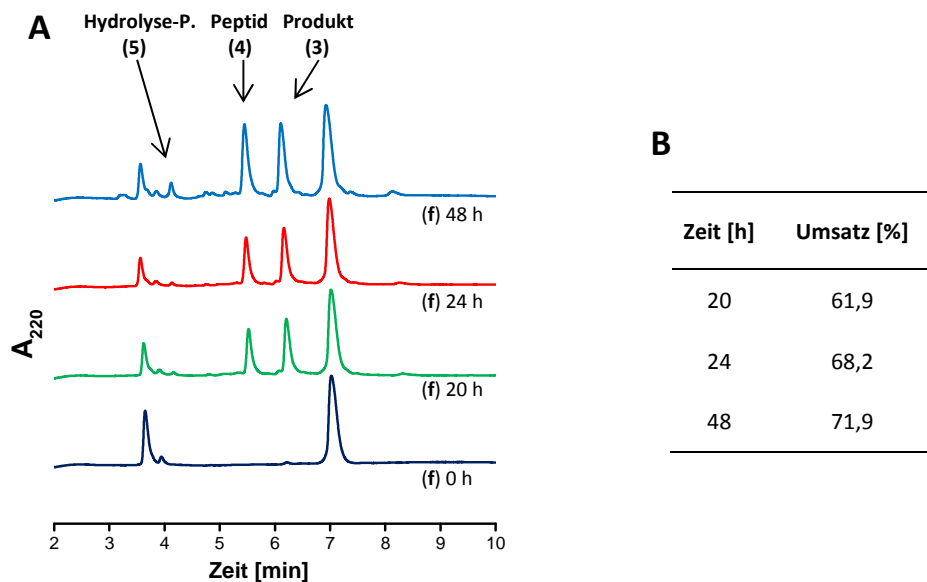


Abbildung 5.26: Untersuchung der Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates während der SML

A RP-HPLC-Chromatogramme des Reaktionsansatzes **f** nach Inkubationszeiten von 0 – 48 h. Mit zunehmender Inkubationszeit weisen zwei zusätzliche Peaks mit Retentionszeiten von 5,6 min und 6,4 min auf die Bildung des Peptids **4** und des Ligationsprodukts (**3**) hin. Nach 48 h Inkubation ist der Peak des Hydrolyse-Produkts (**5**) ($t_R = 4,3$ min) zu erkennen. **B** Der prozentuale Umsatz steigt mit längerer Inkubationszeit.

5.5.3.2. Optimierung weiterer Parameter der SML

Die Sortase A-vermittelte Transpeptidierung ist reversibel, da nach der Transpeptidierung das LPETG-Motiv im Ligationsprodukt (**3**) verbleibt und somit erneut als Substrat fungieren kann.^[56] Um das Reaktionsgleichgewicht in Richtung Ligationsprodukt zu verschieben, sollte der Einsatz eines Überschusses an Glycin-Nukleophil zu höheren Umsätzen führen.^[84]

Zu diesem Zweck wurden in weiteren Optimierungsversuchen die molaren Verhältnisse des Enzyms und der Peptide (Reaktionsansätze **g** bis **i**) variiert und nach 24 h der Umsatz berechnet (Abbildung 5.27). Im Reaktionsansatz **d** wurden 0,1 Äquivalente der Sortase und die Peptide in äquivalenten Konzentrationen eingesetzt (vgl. 5.5.3.1). Der entsprechende Umsatz betrug 68,2 %. Eine Erhöhung der Sortase-Konzentration (**g**) führte zu einer Erhöhung des Umsatzes um 11 %, wobei ebenfalls durch die Zunahme des Peptids **4** eine verstärkte Hydrolyse angedeutet war. Der Einsatz eines Überschusses an Glycin-Nukleophil (**h**) führte zu einem höheren Umsatz von 83,7 %. Der Anteil einer Hydrolyse war vergleichbar zum Reaktionsansatz äquivalenter Konzentrationen an Peptiden (**d**). Die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in Richtung der Produkte durch Erhöhung der Glycin-Nukleophil-Konzentration steht in guter Übereinstimmung zu Literatur Ergebnissen. In diesen führte der Einsatz von äquivalenten Konzentrationen an Substrat zu einem Umsatz von ~50 % und die Erhöhung auf 2 Äquivalente Glycin-Nukleophil zu einem Umsatz bis zu 80 % bei einer Reaktionszeit von 8 h. [84]

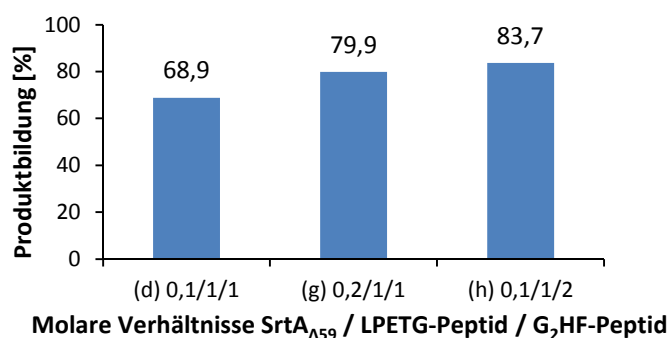


Abbildung 5.27: Variation der molaren Verhältnisse von Enzym und Glycin-Nukleophil (2) der SML

Der Einsatz von 0,1 Äquivalenten Enzym und äquimolaren Verhältnissen an Substrat (**d**) führte zu einem Umsatz von 68,9 % nach einer Reaktionszeit von 24 h. In den Reaktionsansätzen **h** und **i** wurde das molare Verhältnis des Enzyms (**g**) und des Glycin-Nukleophils (**1**) (**i**) verdoppelt und der Umsatz nach 24 h Inkubation berechnet. Beide Testansätze weisen eine höhere Produktbildung von 79,9 % und 83,7 % auf.

Die SrtA₅₉ aus *Staphylococcus aureus* besitzt eine Calcium-Bindestelle, durch die sich bei Bindung von Calcium die Substrataffinität erhöht. Demzufolge kann Calcium als Aktivator der Transpeptidierungsreaktion der SrtA₅₉ betrachtet werden. [49,50] Die bisher beschriebenen Reaktionen wurden in BS-Reaktionspuffer mit 5 µM Calciumchlorid durchgeführt. Um zu testen, ob eine höhere Calcium-Konzentration die Aktivität der Sortase verbessert, wurde die Enzymkatalyse mit einem höheren Calciumchlorid-Gehalt von 10 µM im Reaktionsansatz **i** untersucht. [49] Beide Konzentrationen an Calciumchlorid zeigten bei den Testreaktionen einen vergleichbaren Umsatz (**i** 66,1 % 10 µM CaCl₂; **d** 68,9 % 5 µM CaCl₂).

Die Aktivität der Sortase A konnte somit durch eine höhere Calcium-Konzentration nicht gesteigert werden. In der Literatur sind viele Beispiele von Peptid-Ligationen durch Sortase beschrieben, bei denen eine Calcium-Konzentration von 5 μM im Reaktionspuffer eingesetzt wird. [40,78,83,84] Experimente zur Ligation von Peptiden lieferten unter vergleichbaren Parametern und einer Calcium-Konzentration von 5 μM einen Umsatz von $\sim 75\%$. [78] Somit sind die erreichten Produktumsätze der Etablierung der SML in dieser Arbeit vergleichbar mit entsprechenden Literaturwerten.

Ferner wurde die Stabilität der SrtA $\Delta 59$ -Aktivität analysiert, wobei SrtA $\Delta 59$ -Chargen eingesetzt wurden, die sich durch verschiedene Lagerungsarten voneinander unterschieden (4 °C, -20 °C, -80 °C). Hier zeigten sich nur geringfügige Unterschiede von gemittelt $\pm 2,4\%$ im Umsatz (Daten nicht gezeigt). Demzufolge musste das Enzym nicht jeweils frisch exprimiert und aufgereinigt werden, sondern konnte auch nach mehreren Wochen Lagerung bei -80 °C für die Transpeptidierungsreaktion eingesetzt werden. Dies steht in Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen Stabilität und Robustheit des Enzyms. [82, 83]

Als optimale Parameter stellten sich abschließend der Einsatz von 600 μM G₂HF-Peptid (**1**), 300 μM LPETG-Peptid (**2**), 30 μM SrtA $\Delta 59$ und eine Inkubationszeit von 24 h in BS-Reaktionspuffer mit 5 μM CaCl₂ heraus. Der Einsatz eines Überschusses des Glycin-Nukleophils (**1**) resultierte in dem maximal erreichten Umsatz von 83,7 % im Reaktionsansatz **h**. Die optimierte Inkubationszeit von 24 h führte bei Reaktionsansätzen mit äquimolaren Peptidverhältnissen und 0,1 Äquivalenten Enzym (**d**) zu guten Produktumsätzen von durchschnittlich $67,2 \pm 1,7\%$ (4 Reaktionen). Eine längere Inkubationszeit erhöhte zwar den Umsatz, führte aber auch zu einem höheren Anteil des Hydrolyseprodukts des Acyl-Enzym-Intermediates. Der Einsatz einer höheren Konzentration an Calciumchlorid konnte die Aktivität des Enzyms nicht steigern. Insgesamt ist eine höhere Umsetzung durch die Reversibilität der Transpeptidierungsreaktion erschwert. Ein Ansatz die Reversibilität der Sortase A-vermittelten Transpeptidierung zu vermeiden, wäre der Einsatz eines LPXTG-Peptids mit einer Depsipeptid-Bindung zwischen Thr und Gly. Durch die Eliminierung eines Glycolsäurederivats steht dieses nicht als Nukleophil einer Rückreaktion zur Verfügung. [84] Da das Ziel der Etablierung der SML die Cyclisierung des PhoB^{DBD}-Proteins war, wurde auf den Einsatz eines Depsipeptids zur Erhöhung des Umsatzes verzichtet.

Insgesamt konnte durch den RP-HPLC-basierten Assay die Aktivität des Enzyms nachgewiesen und die Transpeptidierungsreaktion erfolgreich etabliert werden. Der Umsatz unter optimierten Bedingungen der SrtA $\Delta 59$ -vermittelte Ligation der beiden Testpeptide lag bei $\sim 84\%$.

5.6. Sortase A-vermittelte PhoB^{DBD}-Cyclisierung

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war die Herstellung eines cyclischen PhoB^{DBD}-Proteins. Hierzu wurde die Sortase A-vermittelte Transpeptidierung angewendet, die eine *head-to-tail*-Cyclisierung des Proteins ermöglichen sollte. Die Transpeptidierung wurde zuvor durch Ligation von Peptiden in einem HPLC-basierten Assay etabliert und anschließend für die intramolekulare Transpeptidierung einer PhoB^{DBD}-Mutante zu einem kovalent geschlossenen, cyclischen Protein verwendet. Um die Sortase-vermittelte Transpeptidierung zur Cyclisierung von Proteinen einsetzen zu können, musste das zu cyclisierende Protein einen N-terminalen Glycinrest und die exponierte C-terminale Sortase A-Erkennungssequenz LPXTG aufweisen. Dementsprechend wurde eine PhoB^{DBD}-Mutante mit diesen bifunktionellen Eigenschaften hergestellt.

5.6.1. Darstellung der bifunktionellen PhoB^{DBD}-Mutante für die Cyclisierung

5.6.1.1. Herstellung der Mutante MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG

Zur Herstellung der PhoB^{DBD}-Mutante mit N-terminalem Glycinrest und LPXTG-Erkennungssequenz wurde das pPhoB^{DBD}_WT-Plasmid als Ausgangsvektor eingesetzt. Es wurden die N-terminale Aminosäuresequenz H-MAVE des Ausgangsvektors zu H-MGGA und die C-terminale die Sequenz RFSTR-OH zu einem LPSTG-Motiv und einem anschließenden His-*tag* mutiert. Das durch mehrere PCRs erhaltene Konstrukt pMG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG ist in Abbildung 5.28 schematisch dargestellt. Damit der Aminoterminele Glycinrest als Nukleophil der Reaktion dienen kann, musste die erste Aminosäure, das Methionin *in vivo* durch die endogene *E. coli* Methionin-Aminopeptidase (MAP) abgespalten werden. Für eine effiziente *in vivo* Spaltung des Methionins wurde die N-terminale Sequenz des Wildtyp PhoB^{DBD}-Proteins von H-MAVE nicht nur zu zwei Glycinen an Position zwei und drei mutiert, sondern zusätzlich an vierter Position zu Alanin (H-MGGA) mutiert. Eine effiziente *in vivo* Spaltung des Methionins bei überexprimierten Proteinen ist häufig abhängig von der Größe der Seitenketten nachfolgender Aminosäuren. [141] Meinnel et. al konnten in Experimenten zeigen, dass die Aminosäuren in den beiden ersten Positionen nach Methionin eine starke Beeinflussung der Spaltungseffizienz aufweisen. [142] Im Fall des MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Proteins sind diese beiden Aminosäuren Glycine, die die Spaltungseffizienz nicht negativ beeinflussen sollten. Aber auch die nachfolgende Position spielt eine Rolle bei der *in vivo*

Spaltung des Methionin und diesbezüglich besitzt die Aminosäure Glutaminsäure (vgl. Wildtyp-Protein) einen negativen Einfluss auf die Spaltung. Im Gegensatz dazu beeinflusst Alanin die Methionin-Spaltung nicht negativ.^[142] Aus diesem Grund wurde die Mutante MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG hergestellt, bei der die vierte Aminosäure Glu zu Ala mutiert ist (Abbildung 5.28 B).

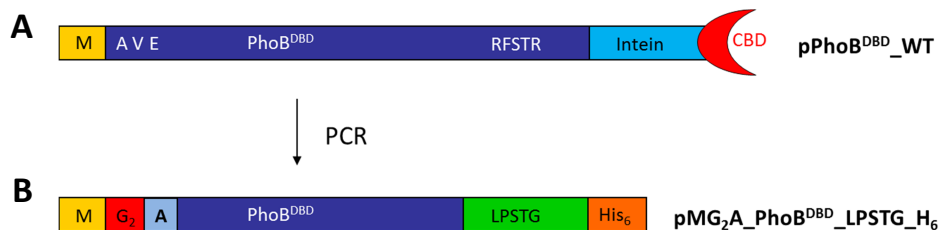


Abbildung 5.28: Plasmid-Konstrukte zur Herstellung der MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Mutante

Durch mehrere PCRs wurde aus dem Ausgangsplasmid pPhoB^{DBD}_WT (A) das Plasmid pMG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG_H₆ (B) mit Sortase A-Erkennungssequenz (LPSTG, grün) und dem N-terminalen Glycin (G₂, rot) hergestellt. Ferner wurde die vierte Aminosäure für eine effiziente *in vivo* Spaltung des Methionins von Glu zu Ala mutiert (hellblau). Zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurde ein C-terminaler His-tag eingefügt (His₆, orange).

Die zweite Anforderung an ein bifunktionelles Substrat für die Sortase-vermittelte Cyclisierung besteht in einem exponierten, C-terminalen Sortase A-Erkennungsmotiv. Der C-Terminus des Wildtyp-Proteins endet mit den Aminosäuren RFSTRF-OH. Diese Sequenz wurde unter Berücksichtigung des LPXTG-Erkennungsmotives zu den Aminosäuren RLPSTGF-OH mutiert. In der Literatur wurde das LPSTG-Motiv bereits erfolgreich zur Protein-Ligation eingesetzt.^[97] Des Weiteren wurde der PhoB^{DBD}-Mutante C-terminal zur LPSTG-Sequenz ein His-tag eingefügt (Abbildung 5.28 B). Dieser dient nicht nur für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins, vor allem ermöglicht dieser auch eine Abtrennung des Protein-Substrats von dem cyclischen Produkt nach erfolgter Cyclisierung, bei welcher der His-tag entfernt wird. Außerdem sollte ein His-tag die Zugänglichkeit des Erkennungs-Motivs nicht beeinträchtigen.^[97] Eine Aufreinigung über das im Ausgangsvektor enthaltene Intein und die Chitin-Bindedomäne würde zu einem tag-freien Protein führen, das sich in den nachfolgenden Cyclisierungsexperimenten erstens in der Masse nur geringfügig vom cyclischen Produkt unterscheiden würde und zweitens keine Abtrennung des Protein-Substrats aus dem Reaktionsansatz erlaubt.

Die angewendeten, molekularbiologischen Methoden zu Klonierung sind in den Abschnitten 4.1 und 4.2 beschrieben, darunter auch die ortsgerichtete Mutagenese-PCR (4.2.8). Alle zur Herstellung der Mutanten verwendeten *primer*-Sequenzen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. In einer ersten PCR wurde die N-terminus Sequenz MAV zu MGG (*primer* NdeI_G2_PhoB fwd),

gleichzeitig am C-Terminus die Sequenz RFSTRV zu LPSTG mutiert und die ersten vier Histidine des eingefügt (*primer* SapI_PhoB_H4 rev). In der zweiten PCR wurde der His-tag vervollständigt (*primer* NdeI_G2_PhoB fwd und SapI_PhoB_H6 rev). Damit die Sortase A-Erkennungssequenz für das Enzym gut zugänglich ist, wurde in einer weiteren Mutagenese-PCR eine Stopp-Sequenz hinter den His-tag eingefügt, um ein rekombinantes Protein ohne die Intein-Sequenz zu erhalten (*primer* LPSTG_Stop fwd und LPSTG_Stop rev). Für die effiziente *in vivo* Spaltung des Methionins wurde die vierte N-terminalen Aminosäure Glutaminsäure des Konstruktes pPhoB^{DBD}_LPSTG_H₆_Stop zu Alanin in einer abschließenden PCR substituiert (*primer* MG₂A_PhoB fwd und MG₂A_PhoB rev). Nach der PCR wurden die jeweiligen Konstrukte mittels Sequenzierung auf ihre korrekte Sequenz überprüft. Das abschließend erhaltene Konstrukt pMG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG_H₆ wurde zur Herstellung des rekombinanten MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG Proteins in *E. coli* ER2566 transformiert.

5.6.1.2. Expression der Mutante MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG

Die Expression des Proteins erfolgte analog zum PhoB^{DBD}_WT-Protein im 1,6 l Maßstab in Ampicillin-haltigem LB-Medium (4.1.6, vgl. 5.1). Das SDS-Gel in Abbildung 5.29 zeigt die Expression des MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Proteins. In den Spuren 1 und 2 sind die Proben der ersten beiden Stunden der Kultivierung zu sehen. Nach zwei Stunden wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch IPTG induziert. Die Spuren 3 - 6 zeigen die stündlichen Kontrollen der Expression. In allen Spuren ist die Expression des Zielproteins MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG durch eine Bande bei 13 kDa deutlich erkennbar. In den ersten beiden Spuren deutet die Bande darauf hin, dass das Zielprotein bereits basal und ohne IPTG-Induktion exprimiert wurde.

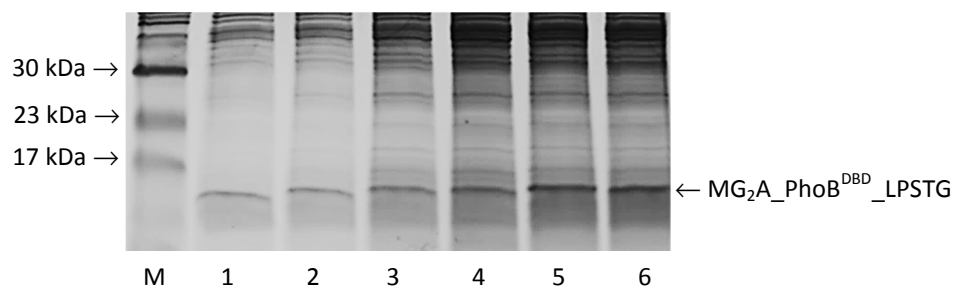


Abbildung 5.29: Expressionskontrolle des MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Proteins mittels SDS-PAGE

Die Expression des MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Proteins (13 kDa) wurde per SDS-PAGE überprüft. Die Spuren 1 und 2 zeigen den Kulturüberstand nach einer bzw. zwei Stunden. Nach zwei Stunden wurde die Expression des Zielproteins durch IPTG Zugabe induziert. Die Spuren 3 bis 6 zeigen die Bildung des MG₂A_PhoB^{DBD}_LPTG-Proteins über 4 h Kultivierung. 18 %iges SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie.

5.6.1.3. Aufreinigung der Mutante MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG

Durch den His-tag des MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Proteins wurde dies, wie bereits für das Protein SrtA_{Δ59}-Protein beschrieben, mit Hilfe der HisTalon-Affinitätschromatographie aufgereinigt (4.3.2.2, vgl. 5.5.1). Das aufgereinigte Protein wurde per SDS-PAGE auf seine Reinheit untersucht (Abbildung 5.30). Dabei zeigte sich, dass mehrere Verunreinigungen vorlagen.

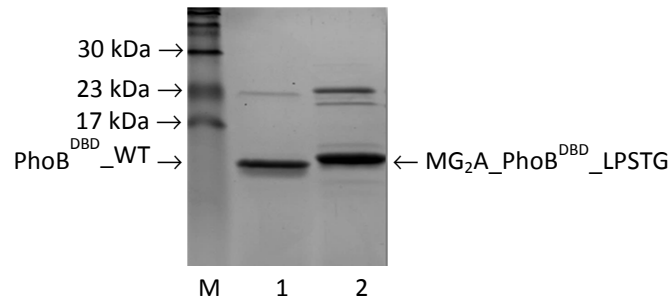


Abbildung 5.30: SDS-PAGE aufgereinigter PhoB^{DBD}-Proteine

Zur Überprüfung der Reinheit wurde das MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Protein in Spur 2 aufgetragen. Die ausgeprägte Bande bei ~ 13 kDa entspricht dem Zielprotein, die weiteren Banden machen Verunreinigungen deutlich. In Spur 1 ist zum Vergleich das PhoB^{DBD}_WT-Protein (12 kDa) aufgetragen. 18 %iges SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie.

Abbildung 5.30 zeigt die aufgereinigten Proteine PhoB^{DBD}_WT und MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG. In Spur 1 belegt eine deutliche Bande in Höhe von ~ 12 kDa das aufgereinigte PhoB^{DBD}-WT-Protein mit einer theoretischen Masse von 12,2 kDa. Die Probe des aufgereinigten MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Proteins in Spur 2 bestätigt mit einer ausgeprägten Bande bei ~ 13 kDa das erwartete Zielprotein mit einer theoretischen Masse von 12,7 kDa. Zusätzlich weisen weitere Banden auf Verunreinigungen hin, aufgrund derer das MG₂A_PhoB^{DBD}-LPSTG-Protein weiter aufgereinigt wurde. Die MG₂A_PhoB^{DBD}-LPSTG-Mutante konnte durch HisTalon-Affinitätschromatographie mit einer Ausbeute von 1 - 2 mg pro Liter Kulturvolumen aufgereinigt werden.

Um die Verunreinigungen des mittels HisTalon-Affinitätschromatographie aufgereinigten MG₂A_PhoB^{DBD}-LPSTG-Proteins zu entfernen, wurde das Protein durch eine Größenausschluss-Chromatographie mit einem Äkta Explorer System (GE Healthcare) weiter aufgereinigt (4.3.2.3). Abbildung 5.31 zeigt ein Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatographie des MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Proteins. Zuerst eluierten in einem sehr breiten Peak Proteine höhermolekulare Verunreinigungen. Vergleicht man die Ausgangsprobe in Abbildung 5.30 (Spur 2), so zeigt das SDS-Gel eine starke Verunreinigung im Bereich von ~ 24 kDa, welche aufgrund ihrer Größe vor dem Zielprotein eluierten. Der

zweite schmale Peak (24 – 28 min) wurde dem Zielprotein zugeordnet. Die eluierten Proteine wurden in Fraktionen aufgefangen und auf ihre Reinheit per SDS-PAGE analysiert.

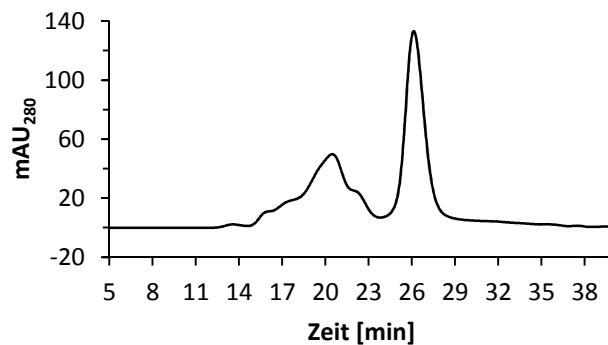


Abbildung 5.31: Größenausschluss-Chromatographie des MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG Proteins

Chromatogramm der Aufreinigung des MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG Proteins bei $\lambda = 280$ nm. Der Kurvenverlauf zeigt, dass Verunreinigungen im breiten ersten Peak von dem Zielprotein im zweiten steilen Peak getrennt werden konnten.

Abbildung 5.32 zeigt das SDS-Gel der erfolgreichen Separation des MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG-Proteins von den Verunreinigungen. Die Spuren 1 – 5 zeigen Proben der Fraktionen von 18 – 23 min, in denen deutlich die Verunreinigungen zu erkennen sind. Aber auch eine geringe Menge des Zielproteins wurde bereits in diesen Fraktionen eluiert. Das Zielprotein MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG war in den Fraktionen von 25 – 28 min enthalten, wie in den Spuren 6 – 8 zu sehen ist. Die vereinigten Fraktionen des aufgereinigten Proteins führten zu Ausbeuten von 20 – 40 % an MG₂A_Phob^{DBD}-Protein (100 – 300 μ g Protein, 3 Aufreinigungen).

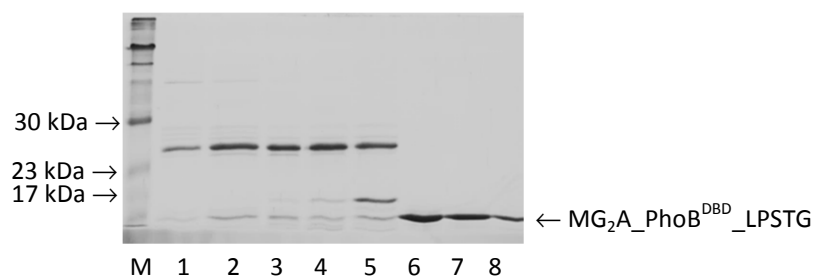


Abbildung 5.32: SDS-PAGE der Fraktionen des aufgereinigten MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG Proteins

In den Spuren 1 – 8 sind die Fraktionen der Größenausschluss-Chromatographie in gleicher Abfolge der Elution aufgetragen. In den Spuren 1 – 5 sind deutliche Verunreinigungen zu erkennen, die dem ersten Peak der Größenausschluss-Chromatographie zu zuordnen sind (vgl. Abbildung 5.31). Die Spuren 6 – 8 zeigen jeweils eine einzelne Bande des Zielroteins MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG (13 kDa) ohne weitere Verunreinigungen. 18 %iges SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie.

Die drei unterschiedlichen Banden der SDS-PAGE (Abbildung 5.32) wurden zur weiteren Identifizierung tryptisch verdaut und per *peptide mass fingerprinting* (PMF) analysiert (4.3.11.4). Die PMF-Ergebnisse der Verunreinigungen in Spur 2 (~ 24 kDa) und in Spur 5 (~ 17 kDa) zeigten, dass kein PhoB^{DBD} in den Proben enthalten war. Ferner konnte auch über eine „*Mascot Peptide Mass Fingerprint*“ Suche kein weiteres Protein eindeutig identifiziert werden. [114] Demzufolge konnte die Identität der Proteine der beobachteten Verunreinigungen nicht aufgeklärt werden.

Ein Vergleich der detektierten Massen der Bande in Spur 6 (~ 13 kDa) mit den theoretischen Molekulargewichten der *in silico* geschnittenen Fragmente für das MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Protein und des N-terminalen Fragments ohne Methionin (G₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG) bestätigte, dass in der Probe beide Protein-Fragmente enthalten waren (vgl. Tabelle 5.8). Für das MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Protein wurde die Masse des charakteristischen Fragmentes des N-Terminus mit Methionin [1-20] detektiert. Zusätzlich konnte auch die Masse des N-terminalen Fragmentes ohne Methionin [2-20] nachgewiesen werden. Für das PhoB^{DBD}-Protein wurde eine Sequenzübereinstimmung von 97,3 % erreicht und eine „*Mascot Peptide Mass Fingerprint*“ Suche verifizierte das PhoB-Protein (Abbildung 5.33). Durch die PMF-Analyse konnte dementsprechend das MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Protein eindeutig identifiziert und eine Spaltung des Methionins belegt werden.

Tabelle 5.8: Ergebnisse der PMF-Analyse nach tryptischem Verdau von MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG

Die PMF-Analyse bestätigt die Massen der Fragmente für den N-Terminus mit und ohne Methionin des MG₂A_PhoB^{DBD}-LPSTG-Proteins (Charakteristische Fragmente sind in rot markiert).

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
733,35	733,40	-68,6	65,13	[89-94] r.MVQTVR.g	C ₃₀ H ₅₆ N ₁₀ O ₉ S
839,44	839,47	-37,0	46,04	[69-75] r.TVDVHIR.r	C ₃₆ H ₆₂ N ₁₂ O ₁₁
951,45	951,46	-16,0	37,31	[80-88] k.ALEPGGHDR.m	C ₃₉ H ₆₂ N ₁₄ O ₁₄
1079,56	1079,56	-3,8	17,42	[79-88] r.KALEPGGHDR.m	C ₄₅ H ₇₄ N ₁₆ O ₁₅
1427,72	1427,73	-4,6	40,84	[37-47] k.LLHFFMTHPER.v	C ₆₇ H ₉₈ N ₁₈ O ₁₅ S
1764,82	1764,82	1,5	60,66	[21-36] r.VMAGEEPLMGPTFEK.I	C ₇₇ H ₁₂₁ N ₁₇ O ₂₆ S ₂
1821,84	1821,83	2,2	37,70	[95-110] r.GTGYLPSTGFHHHHH.	C ₈₂ H ₁₀₈ N ₂₈ O ₂₁
1996,99	1996,98	8,9	38,05	[2-20] . GGAE VIEMQGLSLDPTSHR.v	C ₈₃ H ₁₃₇ N ₂₅ O ₃₀ S
2072,03	2072,02	2,7	69,62	[52-68] r.EQLLNHVWGTNVYVEDR.t	C ₉₂ H ₁₃₈ N ₂₆ O ₂₉
2128,04	2128,02	10,4	25,00	[1-20] . MGGAE VIEMQGLSLDPTSHR.v	C ₈₈ H ₁₄₆ N ₂₆ O ₃₁ S ₂

MGGAEVIEMQ GLSLDPTSHR VMAGEEPLEM GPTEFKLLHF FMTHPERVYS
REQLLNHVWG TNVYVEDRTV DVHIRRLRKA LEPGGHDRMV QTVRGTGYLP
STGFHHHHHH

Abbildung 5.33: Sequenzübereinstimmung von MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG bei der PMF-Analyse

Die bei der PMF-Analyse übereinstimmenden Aminosäuresequenzen von MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG sind unterstrichen dargestellt. Insgesamt wurde eine Sequenzübereinstimmung von 97,3 % erreicht.

Für eine zusätzliche Charakterisierung und einer weiteren Bestätigung der erfolgreichen *in vivo* Spaltung des Methionins des MG₂A_Phob^{DBD}-LPSTG-Proteins, wurde eine MALDI-ToF-MS-Analyse durchgeführt (Abbildung 5.34). Die erwartete theoretische Masse für die Mutante MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG beträgt $m/z = 12694 [M+Na]^+$, dieser konnte ein Peak bei $m/z = 12693 [M+Na]^+$ zugeordnet werden. Die theoretische Masse des Proteins G₂A_Phob^{DBD}-LPSTG ist um $m/z = 131$ durch das abgespaltene Methionin reduziert. Der detektierte Peak bei $m/z = 12563$ entspricht einer Differenz von $130 m/z$ und kann dem G₂A_Phob^{DBD}-LPSTG-Protein mit einer theoretischen Massen von $m/z = 12563 [M+Na]^+$ zugeordnet werden. Die Analyse des rekombinanten MG₂A_Phob^{DBD}-LPSTG-Proteins durch MALDI-ToF-MS zeigte somit eine gute Übereinstimmung der detektierten und theoretischen Massen für das Protein mit und ohne Methionin und bestätigte die Ergebnisse der PMF-Analyse. Aufgrund des MALDI-ToF-MS-Spektrums lässt sich abschätzen, dass bei ungefähr der Hälfte der Proteine eine Spaltung des Methionins erfolgt ist.

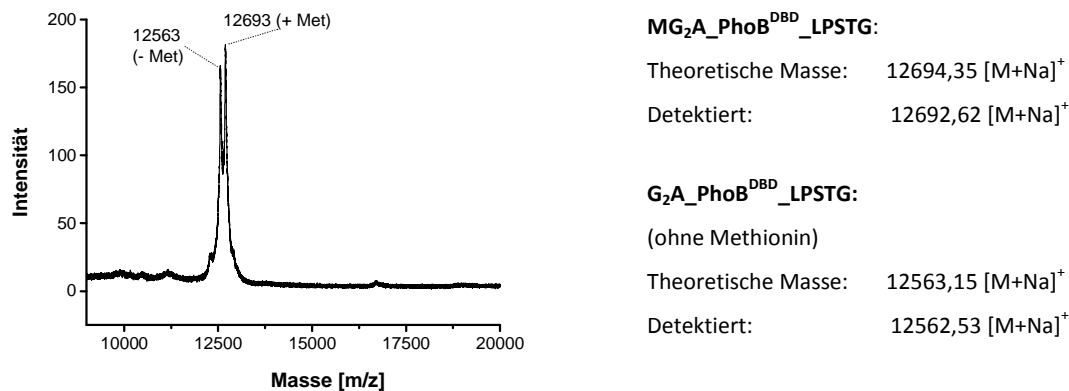


Abbildung 5.34: MALDI-ToF-MS-Analyse des aufgereinigten MG₂A_Phob^{DBD}-LPSTG-Proteins

Das Spektrum zeigt zwei deutliche Peaks für das MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG-Protein ($m/z = 12693 [M+H]^+$) und das Protein mit abgespaltenem Methionin G₂A_Phob^{DBD}_LPSTG ($m/z = 12563 [M+H]^+$).

Insgesamt konnte die Mutante MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG erfolgreich dargestellt werden. Eine teilweise *in vivo* Spaltung des Methionins zum Protein G₂A_Phob^{DBD}_LPSTG konnte nachgewiesen und somit ein N-terminaler Glycinrest als Nukleophil für die Sortase-vermittelte Transpeptidierung zugänglich gemacht werden.

5.6.2. Srt_{Δ59}-vermittelte Cyclisierung von PhoB^{DBD}

Nachdem die Srt_{Δ59}-vermittelte Transpeptidierung mit den Testpeptiden etabliert worden war, wurde das Enzym zur Cyclisierung des MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Proteins eingesetzt (Abbildung 5.35). Die dazu benötigte MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Mutante wurde, wie beschrieben, molekularbiologisch hergestellt und aufgereinigt. Die Cyclisierung wurde mittels MALDI-ToF-MS, SDS-PAGE und PMF überprüft. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Protein oder ohne Sortase.

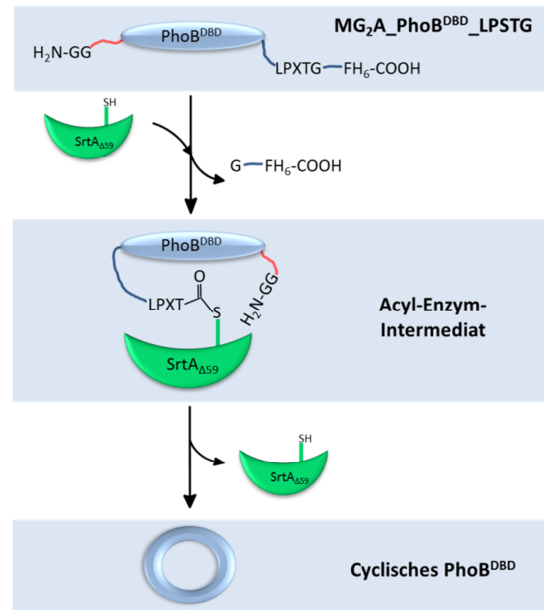


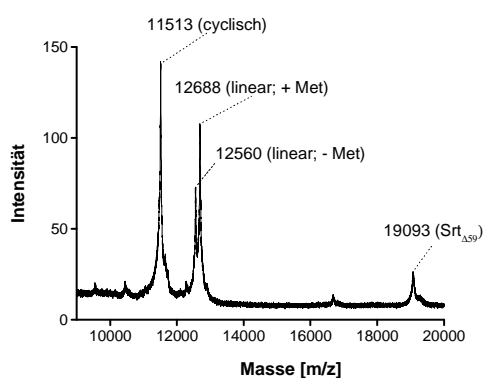
Abbildung 5.35: Sortase A-vermittelte Cyclisierung des PhoB^{DBD}-Proteins

Für die Cyclisierung wurde als Srt_{Δ59}-Substrat die bifunktionelle Mutante MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG mit C-terminalem LPSTG-Erkennungsmotiv und zu Diglycin mutierter N-terminaler Sequenz eingesetzt.

In ersten Versuchen zur Cyclisierung war die Löslichkeit der MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Mutante problematisch. Der aus der Literatur bekannte Reaktionspuffer (AS-Puffer) und eine Calciumchlorid-Konzentration von 10 μM führte zu einer Präzipitation des Proteins während der Reaktion.^[97] Erst durch die Verwendung des HEPES-haltigen BS-Puffers mit einer Calciumchloridkonzentration von 5 μM konnte eine sichtbare Präzipitation bei einer maximalen Konzentration von 40 μM des PhoB^{DBD}-Proteins verhindert werden (Puffer siehe 3.11.6).^[83]

5.6.2.1. Initiale Experimente zur Cyclisierung von PhoB^{DBD}

In initialen Experimenten zur Sortase A-vermittelten Cyclisierung von PhoB^{DBD} wurden im Reaktionsansatz **j** SrtA_{Δ59} (40 μM), und MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG (40 μM) in BS-Puffer mit Calciumchlorid (5 μM) eingesetzt. Abbildung 5.36 zeigt das MALDI-ToF-MS-Spektrum der Reaktionskontrolle nach einer Inkubationszeit von 4 h. Das Signal bei $m/z = 11513$ entspricht dem cyclisierten Produkt mit einer theoretischen Masse von $m/z = 11518$ [M+Na]⁺. Die weiteren detektierten Massen von $m/z = 12688$ und $m/z = 12560$ entsprechen den [M+Na]⁺-Peaks des Protein-Substrats mit und ohne N-terminalem Methionin. Die Zuordnung der detektierten Massen lassen auf eine Bildung eines cyclischen PhoB^{DBD}-Proteines schließen.



Protein	theor. [m/z]	detekt. [m/z]	
Cycl. PhoB ^{DBD}	11518,08	11513,24	[M+Na] ⁺
Lin. PhoB ^{DBD} (- Met)	12563,15	12560,14	[M+Na] ⁺
Lin. PhoB ^{DBD} (+ Met)	12694,35	12687,81	[M+Na] ⁺
Srt _{Δ59}	19092,31	19093,32	[M+Na] ⁺

Abbildung 5.36: MALDI-ToF-MS-Spektrum der Cyclisierungsreaktion von MG₂A_PhoB^{DBD}-LPSTG (j)

Der Einsatz von MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG als Substrat zur Cyclisierung mittels SML führte zu einem cyclischen PhoB^{DBD}-Protein zuzuordnenden Signal bei $m/z = 11517$ [M+Na]⁺. Des Weiteren zeigt das Spektrum Signale für das MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Substrat mit und ohne *in vivo* gespaltenem Methionin ($m/z = 12688$ [M+Na]⁺; $m/z = 12560$ [M+Na]⁺).

Eine weitere Überprüfung der Bildung des cyclischen PhoB^{DBD}-Proteins erfolgte per SDS-PAGE. Abbildung 5.37 zeigt in Spur 1 einer Probe des Reaktionsgemisches (**j**) nach 4 h Inkubation. Für einen Vergleich der Laufverhalten zeigt das SDS-Gel in Spur 2 die reine SrtA_{Δ59} (Ansatz **k**; 24 kDa) und in Spur 3 das reine Substrat MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG (Ansatz **l**; 12,7 kDa). Diese Proben wurden in äquivalenten Konzentrationen, in gleichen Puffer und Inkubationszeit parallel zur Reaktion **j** behandelt und aufgetragen. Die Sortase A ist durch die ausgeprägte Bande bei ~ 24 kDa in Spur 2 gekennzeichnet. In den initialen Experimenten wurde das nur durch Affinitätschromatographie aufgereinigte MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Protein eingesetzt. Dementsprechend zeigt Spur 3 nicht nur eine einzelne Bande für das Protein (13 kDa), sondern zusätzlich weitere Banden der beschriebenen Verunreinigungen (vgl. 5.6.1.3). Im Vergleich zur Sortase A und dem Protein-

Substrat, sind in der Probe des Cyclisierungsansatzes **j** mehrere zusätzliche Banden zu erkennen (Spur 1). Das cyclisierte PhoB^{DBD}-Protein besitzt eine theoretische Masse von 11,5 kDa und sollte daher eine kürzere Laufzeit im Vergleich zum größeren, linearen Protein-Substrat (13 kDa) im Gel aufweisen. Aufgrund dessen wurde die unterste, schwach ausgeprägte Bande mittels PMF analysiert und dadurch das cyclisierte PhoB^{DBD}-Produkt nachgewiesen. Das SDS-Gel zeigt allerdings, dass die gebildete Menge an Zielprotein sehr gering war und die Cyclisierungsreaktion zum Zielprotein nicht quantitativ verlief.

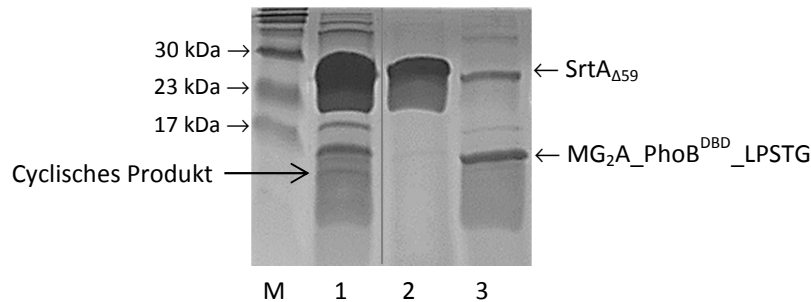


Abbildung 5.37: SDS-PAGE des Cyclisierungsansatzes **j zur Analyse der Sortase A-vermittelten Cyclisierung von PhoB^{DBD}**

Die Bildung des cyclischen PhoB^{DBD}-Proteins wurde mittels SDS-PAGE analysiert. In Spur 1 zeigt die Probe des Reaktionsansatzes **j** nach 4 h Inkubation mit einer schwach ausgeprägten Bande des cyclischen Produktes (12 kDa). Zum Vergleich wurde die SrtA_{Δ59} (**k**; 24 kDa) in Spur 2 und das MG₂A-PhoB^{DBD}_LPSTG-Protein-Substrat (**l**; 13 kDa) in Spur 3 in äquivalenten Mengen aufgetragen. 18 %iges SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie.

Die Identifizierung des cyclischen Produktes erfolgte durch *peptide mass fingerprinting* (PMF). Zu diesem Zweck wurde die unterste Bande in Spur 1 tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert (siehe Beschriftung Abbildung 5.37). Durch den Vergleich der detektierten Massen mit den theoretischen Molekulargewichten der *in silico* geschnittenen Fragmente für das cyclische PhoB^{DBD}-Protein konnte dieses eindeutig nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 5.9). Diesbezüglich wurde ein charakteristisches Fragment [95 - 121], welches die Ligationsstelle mit ligiertem N- und C-Terminus umfasst, detektiert. Bezogen auf die PhoB^{DBD}-Sequenz wurden sechs Massen für Fragmente des Proteins detektiert und eine Sequenzübereinstimmung von 90,1 % erreicht. Obwohl die analysierte Probe aufgrund der Laufhöhe im SDS-Gel kein Enzym beinhalten sollte, wurde eine Masse detektiert, welche einem Fragment der SrtA_{Δ59} zugeordnet werden konnte. Eine einzelne Übereinstimmung ist aber als nicht signifikant einzuordnen.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der MALDI-ToF-MS, SDS-PAGE und PMF, dass eine nachweisbare Menge an cyclisiertem PhoB^{DBD}-Zielprotein gebildet wurde.

Tabelle 5.9: Ergebnisse der PMF-Analyse nach tryptischem Verdau der Cyclisierungsreaktion j

Die PMF-Analyse bestätigt die Massen der Fragmente für das cyclische PhoB^{DBD} (Charakteristisches Fragment in rot markiert). Die Sequenzübereinstimmung beträgt 90,1 % für PhoB^{DBD}.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
PhoB^{DBD}-Fragmente					
951,32	951,46	-152,4	3,53	[80-88] k.ALEPGGHDR.m	C ₃₉ H ₆₂ N ₁₄ O ₁₄
2071,95	2072,02	-32,5	24,97	[52-68] r.EQLLNHVWGTNVVVEDR.t	C ₉₂ H ₁₃₈ N ₂₆ O ₂₉
2577,22	2577,28	-25,1	2,07	[48-68] r.VYSREQLLNHVWGTNVVVEDR.t	C ₁₁₅ H ₁₇₃ N ₃₃ O ₃₅
2773,25	2773,35	-33,9	2,74	[95-121] r.GTGY LPSTGGA EVIEMQGLSLDPTSHR.v	C ₁₁₈ H ₁₈₉ N ₃₃ O ₄₂ S
2892,39	2892,48	-31,0	0,45	[52-75] r.EQLLNHVWGTNVVVEDRTVDVHIR.r	C ₁₂₈ H ₁₉₈ N ₃₈ O ₃₉
3173,45	3173,53	-22,5	0,50	[21-47] r.VMAGEEPLMGPTFEKLLHFFMTHPER.v	C ₁₄₄ H ₂₁₇ N ₃₅ O ₄₀ S ₃
Srt_{A59}-Fragmente					
3052,51	3052,56	-18,7	2,81	[34-61] k.VAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄

5.6.2.2. Charakterisierung der Transpeptidierungsreaktion

Die Ergebnisse der initialen Experimente zeigten, dass die Cyclisierungsreaktion nicht quantitativ zum cyclischen Zielprodukt verlief. Die multiplen Banden der des Reaktionsansatzes **j** ließen auf eine mögliche Bildung von weiteren Produkten schließen (Abbildung 5.37). Konkurrierend zur intramolekularen Cyclisierung des PhoB^{DBD}-Proteins können weitere Reaktionswege, wie eine intermolekulare Oligomerisierung, erfolgen. Diesbezüglich ist die Oligomerisierung von bifunktionellen Sortase-Substraten bereits in der Literatur beschrieben und daher eine potentielle Nebenreaktion. [79,97] Demzufolge wurden die weiteren entstandenen Transpeptidierungsprodukte näher charakterisiert. Der Einsatz des durch Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigten Protein-Substrats und die Verwendung längerer SDS-Gele führte zu gut getrennten, scharfen Banden, die sich für eine Interpretation bezüglich des Laufverhaltens eigneten und zur Analyse der Transpeptidierungsprodukte per PMF eingesetzt werden konnten. Das für die PMF-Analyse verwendete SDS-Gel des Cyclisierungsansatzes **m** (Spur 1) ist in Abbildung 5.38 dargestellt. Im Vergleich zur reinen Sortase A (24 kDa; Ansatz **n**, Spur 2) und dem reinen Protein-Substrat (13 kDa; Ansatz **o**, Spur 3), sind mehrere zusätzliche Banden des Cyclisierungsansatzes **m** zu erkennen (Spur 1). Eine klare Bande für das cyclische Zielprotein, welches unterhalb des linearen Protein-Substrats (13 kDa) laufen sollte, war hier vermutlich aufgrund einer zu geringen Konzentration nicht detektierbar. Allerdings konnte das cyclisierte Produkt mittels PMF der Bande bei ~ 13 kDa nachgewiesen werden.

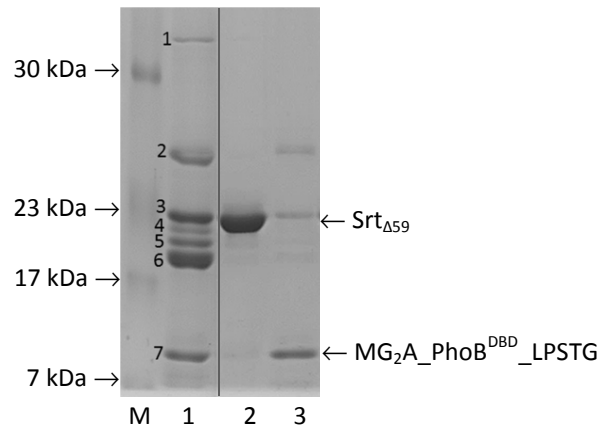


Abbildung 5.38: SDS-PAGE des Cyclisierungsansatzes *m* zur Analyse der Sortase A-vermittelten Cyclisierung von PhoB^{DBD}

In Spur 1 ist der Reaktionsansatz *m* nach 4 h Inkubation aufgetragen. Aufgrund der multiplen Banden des Cyclisierungsansatzes wurde eine PMF-Analyse aller Banden zur Identifizierung der jeweiligen Proteine durchgeführt. Die PMF-Proben sind mit 1 – 7 gekennzeichnet. Zum Vergleich des Laufverhaltens wurde SrtA_{Δ59} (*n*; Spur 2; doppelte Menge im Vergleich zur Spur 1) und das MG₂A-PhoB^{DBD}-LPSTG-Substrat (*o*; Spur 3) aufgetragen. 18 %iges SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie.

Durch eine mögliche intermolekulare Transpeptidierung des PhoB^{DBD}-Proteins entstehen Oligomere, wie das Dimer mit einer Masse von 24 kDa oder das Trimer mit einer Masse von 36 kDa. Diese Produkte könnten durch die gekennzeichneten Banden 1 (~ 36 kDa) und 2 (~ 24 kDa) repräsentiert werden (Abbildung 5.38). Um die Proteine der Banden weiter zu identifizieren, wurden alle Proteinbanden (1 – 7) der Spur 1 tryptisch verdaut und per PMF analysiert. Die detaillierten Ergebnisse der einzelnen PMF-Analysen sind im Anhang dargestellt (Tabelle 8.3 bis Tabelle 8.9). In Probe 1 konnten vier Massen Fragmenten des PhoB^{DBD}-Proteins (Sequenzübereinstimmung von 40,0 %) zugeordnet werden, darunter ein charakteristisches Fragment [95 – 110] für ein lineares Epitop mit C-terminaler His-tag-Sequenz. Obwohl für diese Probe keine Masse für ein PhoB^{DBD}-Fragment mit ligiertem N- und C-Terminus detektiert werden konnte, ist die plausibelste Erklärung für die Bande 1 ein oligomerisiertes PhoB^{DBD}-Protein wie das lineare Trimer. Für dieses spricht überwiegend die Laufhöhe der analysierten Bande im SDS-Gel von ~ 36 kDa (Abbildung 5.38). In den Proben 2 – 5 wurden nur Massen detektiert, die Fragmente für SrtA_{Δ59} kennzeichnen. In Probe 5 wurde zudem eine einzelne, dadurch nicht signifikante Masse für das PhoB^{DBD}-Protein nachgewiesen. Dementsprechend konnte ein oligomerisiertes, lineares PhoB^{DBD}-Dimer (24 kDa) in der Probe 2 durch die PMF-Analyse nicht bestätigt werden.

Auffallend ist die ausgeprägte Bande 6 in Höhe von ~ 20 kDa (Abbildung 5.38). Eine mögliche Erklärung wäre die Bildung eines cyclischen Dimers, welches eine theoretische Masse von 23 kDa besitzen würde und unterhalb des linearen Dimers (24 kDa) im SDS-Gel laufen sollte. Auch die Bildung von cyclischen Dimeren und Oligomeren wurde bereits als

Nebenreaktion der Sortase A-vermittelten Ligation von bifunktionellen Sortase-Substraten in der Literatur beschrieben. [79] Eine direkte Untersuchung zur Bildung von macrocyclischen Peptiden zeigte, dass die Bildung eines cyclischen Dimers ab einer gewissen Länge und bei niedrigen Konzentrationen des bifunktionellen Peptides sogar überwiegt. [143] Die PMF-Analyse der Probe 6, welche die ausgeprägte Bande in Höhe von ~ 20 kDa repräsentiert, bestätigte Massen von acht PhoB^{DBD}-Fragmenten (Sequenzübereinstimmung von 84,5 %). Darunter ist die Masse des charakteristischen Fragmentes [95 – 121] für zwei ligierte PhoB^{DBD}-Proteine. Dieses Ergebnis und besonders die Laufhöhe der analysierten Probe im SDS-Gel sprechen für ein cyclisches Dimer mit einer theoretischen Masse von ~ 23 kDa (Abbildung 5.38). Im Gegensatz dazu konnten in dieser Probe auch die Massen für zwei charakteristische Fragmente des linearen PhoB^{DBD} [95 – 110, 1 – 36] detektiert werden. Dass die PMF-Probe auch Fragmente des linearen PhoB^{DBD} enthielt, könnte durch eine unzureichende Trennung der beiden Proteine im SDS-Gel begründet sein.

In Anbetracht der Bildung eines cyclischen Dimers kann das MALDI-ToF-MS-Spektrum des Reaktionsansatzes **m** neu interpretiert werden (vgl. Anhang, Abbildung 8.7 und Tabelle 8.10). Der Peak von $m/z = 11518$ wurde ursprünglich dem cyclischen Monomer zugeordnet, jedoch kann dieser Peak auch dem doppelten Natrium-Signal des cyclischen Dimers entsprechen. Die theoretische Masse von $m/z = 11518 [M+Na]^+$ des cyclischen Monomers stimmt mit der theoretischen Masse von $m/z = 11518 [M+2Na]^{2+}$ des cyclischen Dimers überein. Demzufolge kann zwar die Bildung einer cyclischen Spezies per MALDI-ToF-MS bestätigt, jedoch aufgrund einer zu geringen Auflösung nicht zwischen dem cyclischen Monomer und dem cyclischen Dimer differenziert werden. Auch eine Aufsummierung der Signale beider Spezies wäre hier denkbar. Das SDS-Gel (Abbildung 5.38) belegt jedoch durch die ausgeprägte Bande bei ~ 20 kDa, welche zusätzlich durch PMF als cyclisches PhoB^{DBD} identifiziert werden konnte, dass die Bildung des cyclischen Dimers entgegen der Bildung des cyclischen Monomers anscheinend favorisiert ist.

Das PMF-Ergebnis der Probe 7, welche der untersten Bande in Höhe von ~ 13 kDa entspricht, bestätigte acht Massen dem PhoB^{DBD}-Protein entsprechender Fragmente mit einer Sequenzübereinstimmung von 72,7 %. Neben einem charakteristischen Fragment des linearen C-Terminus mit His-tag [95 – 110], welches das lineare Protein-Substrat bestätigt, wurde allerdings auch in dieser Probe ein Fragment detektiert, welches die Ligationsstelle mit ligiertem N- und C-Terminus [95 – 121] umfasst (Tabelle 8.9). Dieses Fragment belegt das cyclische PhoB^{DBD}. Aufgrund der Laufhöhe von ~ 13 kDa der analysierten Bande im SDS-Gel machen diese PFM-Ergebnisse deutlich, dass die Probe das lineare Protein-Substrat, aber auch das cyclische Zielprotein enthielt. Eine mögliche Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis wäre, dass eine geringe Menge des cyclischen Monomers nicht von dem Protein-

Substrat im SDS-Gel aufgetrennt wurde. Durch dieses Ergebnis ist folglich die Bildung des Zielproteins im Reaktionsansatz, wenn auch nur in geringen Mengen, bestätigt.

Ein weiterer Punkt, der noch erwähnt werden muss, ist das in allen Proben die Masse desselben Enzymfragmentes [34 – 61] nachgewiesen wurde (vgl. Tabelle 8.3 bis Tabelle 8.9). Einerseits könnte dies an einer generellen Kontamination mit Enzym oder in der Ausbildung des Acyl-Enzym-Intermediates während der Cyclisierungsreaktion liegen. Diese Wechselwirkung der beiden Proteine untereinander könnte zu einer unzureichenden Trennung minimaler Mengen des Enzyms im SDS-Gel geführt haben, was das Vorkommen der Masse für das Enzymfragment in der PMF-Analyse erklären würde. Andererseits ist eine einzelne Masse eines Fragments nicht aussagekräftig genug für die eindeutige Identifizierung des Enzyms in den analysierten Proben.

Insgesamt lassen die Banden des SDS-Gels und die PMF-Daten darauf schließen, dass anstatt der intramolekularen Cyclisierung eine intermolekulare Transpeptidierung zwischen bifunktionellen MG₂A_PohB^{DBD}-Proteinen zu einem cyclischen Dimer im Reaktionsansatz **m** begünstigt erfolgt ist. Als problematisch stellte sich die MALDI-ToF-MS-Analyse heraus, da hier zwischen den Massen eines cyclischen Monomers und Dimer nicht differenziert werden kann. Die Untersuchung der Bande 6 mittels PMF verifizierte die intermolekulare Cyclisierung zwischen zwei PhoB^{DBD}-Proteinen. Die starke Ausprägung dieser Bande im SDS-Gel weist darauf hin, dass hauptsächlich das cyclische Dimer unter den verwendeten Bedingungen der Transpeptidierung gebildet wurde. Demzufolge weist das SDS-Gel keine signifikante Bande für ein cyclisches Monomer auf, jedoch in der PMF-Analyse der Bande bei ~ 13 kDa konnte das ligierte PhoB^{DBD}-Fragment bestätigt und dadurch die Bildung des cyclischen Monomers nachgewiesen werden.

5.6.2.3. Optimierungsversuche zur Cyclisierung von PhoB^{DBD}

Die Charakterisierung der Transpeptidierungsreaktion zeigte, dass die intermolekulare Transpeptidierung zum cyclischen Dimer gegenüber einer Bildung des cyclischen Monomers begünstigt ist. Zur Optimierung der Reaktion für eine höhere Umsetzung zum cyclischen, monomeren PhoB^{DBD}-Protein wurden verlängerte Inkubationszeiten, verschiedene Konzentrationen des MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Proteins und der SrtA_{Δ59}, sowie deren Verhältnisse zueinander, getestet. Dies führte jedoch insgesamt zu keiner distinkten Produktbande des Zielproteins bei der SDS-PAGE und somit nicht zu höheren Ausbeuten an cyclisiertem Monomer.

Bei einer verlängerten Inkubationszeit von 24 h (Reaktionsansatz **p**) zeigte das entsprechende SDS-Gel nur eine stark verschmierte Bande im Bereich des linearen Protein-Substrats und des Zielproteins, dementsprechend konnte keine erhöhte Bildung des cyclischen Monomer erreicht werden (nicht gezeigt). Zudem wurde bei der MALDI-ToF-MS-Analyse ein zusätzlicher Peak mit der Masse von $m/z = 11668$ detektiert, welcher der theoretischen Masse des Hydrolyseprodukts von $m/z = 11667$ $[M+Na]^+$ entspricht (vgl. Anhang, Abbildung 8.8 und Tabelle 8.11). Das Hydrolyse-Produkt der Cyclisierungsreaktion entsteht durch die Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates aus Sortase A und MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Protein. Dies führt zur Abspaltung des C-terminalen Glycin- und His-tag-Restes des Proteins ($m/z = -1027$). Auch die Hydrolyse ist eine bekannte Nebenreaktion der Sortase A-vermittelten Transpeptidierung, die jedoch nur bei einer langen Inkubationszeit verstärkt auftritt.^[42] Die Bestätigung des Hydrolyse-Produktes per MALDI-ToF-MS nach verlängerter Inkubationszeit steht in guter Übereinstimmung zu den Peptid-Testreaktionen der SML, bei denen ebenfalls eine lange Inkubationszeit zu einer vermehrten Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates führte (vgl. 5.5.3.1).

Zur weiteren Optimierung der intramolekularen Cyclisierung wurden verschiedene Konzentrationen des MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Proteins und der SrtA_{Δ59}, sowie deren Verhältnisse zueinander, getestet. Dabei wurden Konzentrationsbereiche eingesetzt, die bereits laut Literatur erfolgreich zur Cyclisierung von Proteinen eingesetzt worden sind.^[79,97] Dies führte jedoch insgesamt zu keiner deutlichen Produktbande des Zielproteins bei der SDS-PAGE, sondern erneut zu vergleichbaren, dispersen Banden wie im Reaktionsansatz **j** der initialen Experimente beschrieben (vgl. 5.6.2.1, Abbildung 5.37). Die PMF-Ergebnisse der Quantifizierung der Transpeptidierungsreaktion (**m**) deckten jedoch auf, dass das cyclische Monomer auch in der Probe der Bande bei ~ 13 kDa nachgewiesen werden konnte. Somit scheint das Zielprotein im SDS-Gel teilweise nicht ausreichend vom linearen Protein-Substrat getrennt worden zu sein. Demzufolge wurden für eine Trennung der cyclischen PhoB^{DBD}-Proteine aus dem Reaktionsgemisch vor der SDS-PAGE HisTalon-Beads zum Reaktionsansatz (**q**) gegeben. Da das lineare Protein-Substrat, sowie mögliche lineare PhoB^{DBD}-Oligomere und auch die Sortase jeweils einen His-tag besitzen, sollten diese über eine Bindung an die Beads aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden können. Des Weiteren wurde die Transpeptidierungsreaktion (**q**) mit einer geringeren Konzentration des Protein-Substrats in einem größeren Maßstab angesetzt. Erstens sollte durch die geringere Konzentration des Substrats die intramolekulare Cyclisierung gefördert werden, zweitens kann durch den größeren Maßstab insgesamt mehr Substrat umgesetzt werden und so ebenfalls zu einer größeren Menge an Zielprotein führen. Dieses sollte nach der

Reaktion durch Affinitäts- und anschließender Größenausschluss-Chromatographie aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt werden. Abbildung 5.39 zeigt in Spur 1 den Reaktionsansatz **q** vor Zugabe der Beads, in Spur 2 den Überstand nach Bindung der His-getaggen Proteine und in Spur 3 die gebundenen Proteine nach Denaturierung der Beads. Durch die Reaktionskontrolle per SDS-Gel stellte sich heraus, dass keine Bande für ein cyclisches Monomer, mit einer theoretischen Masse von 11,5 kDa, detektiert wurde und die Bildung des Zielproteins daher erneut zu gering war (vgl. Abbildung 5.39, Spur 2). Die einzelne Bande bei ~23 kDa in Spur 2 könnte als nicht an die Beads gebundenes Enzym oder als das cyclische PhoB^{DBD}-Dimer interpretiert werden. Das MALDI-ToF-MS-Spektrum der Probe des Überstandes bestätigt jedoch durch den entsprechenden Peak für cyclische PhoB^{DBD}-Spezies ($m/z = 11518$), dass es sich bei dem im SDS-Gel detektierten Protein um das cyclische Dimer handelte (Abbildung 5.40). Darüber hinaus wurde aufgrund der Bildung eines cyclischen Dimers das MALDI-ToF-MS-Spektrum bis zu einer Masse von 30000 m/z aufgenommen. Es konnte zwar kein exaktes Signal für eine Masse des einfach-geladenen Peaks für das cyclische Dimer ($22990,18 [M+H]^+$), detektiert werden, jedoch zeigt das Spektrum in diesem Bereich eine Erhöhung des Hintergrund-Signals an.

Diese Ergebnisse geben weitere Hinweise darauf, dass eine intermolekulare Transpeptidierung zwischen zwei bifunktionellen PhoB^{DBD}-Proteinen auch bei geringen Substratkonzentrationen bevorzugt gegenüber einer Cyclisierung eines PhoB^{DBD}-Proteins unter den verwendeten Parametern stattfand.

Der abschließende Versuch, die Proteine des Überstandes aufzukonzentrieren und anschließend per Größenausschluss-Chromatographie voneinander zu trennen, scheiterte an zu geringen Konzentrationen. Es konnte kein Protein in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden.

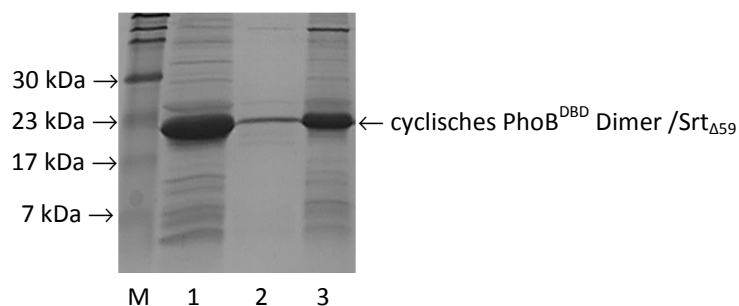


Abbildung 5.39: SDS-PAGE der Aufreinigung mittels HisTalon-Beads des Cyclisierungsansatzes **q**

In Spur 1 ist der Reaktionsansatz **q** nach 4 h Inkubation und in Spur 2 der Überstand nach Zugabe von TALON-Beads aufgetragen. Die einzelne Bande in Höhe von ~23 kDa belegt die Bildung des cyclischen Dimers (Details siehe Text). Die Spur 3 zeigt die gebundenen His-tag Proteine nach Denaturierung der Beads. 18 %iges SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie.

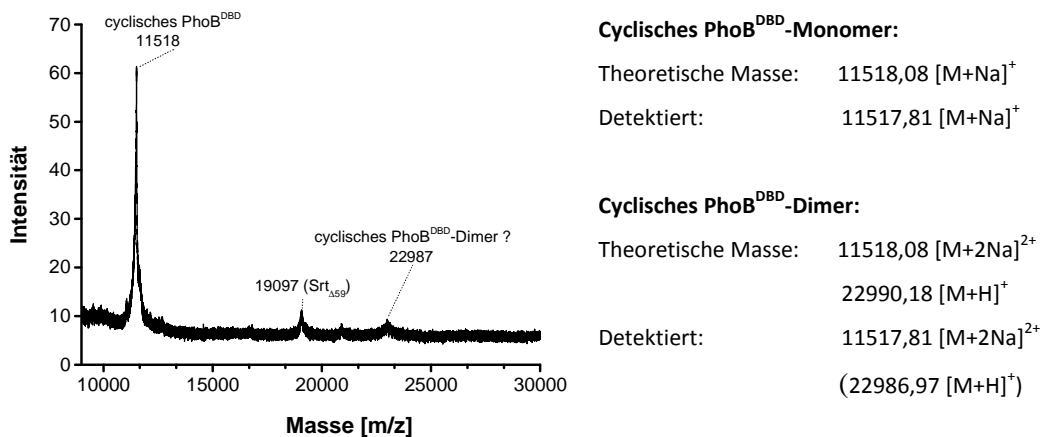


Abbildung 5.40: MALDI-ToF-MS-Spektrum des mittels TALON-Beads aufgereinigten Überstands der Cyclisierungsreaktion q

Die Cyclisierungsreaktion **q** führte zu einem einer cyclischen PhoB^{DBD}-Spezies zuzuordnenden Peak bei $m/z = 11516 [M+Na]^+$ (Details siehe Text).

Insgesamt konnte durch die Sortase A-vermittelte Transpeptidierung das PhoB^{DBD}-Protein cyclisiert werden. Die Bildung geringer Mengen des gewünschten cyclischen PhoB^{DBD}-Monomers konnte per MALDI-ToF-MS, SDS-PAGE und PMF bestätigt werden. Die vollständige Charakterisierung aller per SDS-Gel aufgetrennten Protein-Banden des Reaktionsgemisches ergab allerdings, dass die Bildung des cyclischen PhoB^{DBD}-Monomers nicht in ausreichender Menge erfolgte, sondern die Transpeptidierung auch zu Oligomeren und hauptsächlich zu einem cyclischen Dimer erfolgte. Variierende Konzentrationen und Verhältnisse an Enzym und Protein-Substrat führten nicht zu einer vermehrten Bildung des cyclischen Monomers. Unter anderem scheiterte die Erhöhung der Ausbeute an Zielprotein auch bei der Verwendung größerer Ansätze der Transpeptidierungsreaktion.

5.7. Transpeptidierung mittels immobilisierter Sortase A

Mit der Sortase-vermittelten Transpeptidierung sollte ein cyclisches PhoB^{DBD}-Protein dargestellt werden. Um nach einer Cyclisierung die Trennung des Enzyms von den Substraten und Produkten zu ermöglichen, wurde eine immobilisierbare Variante des Enzyms zur Cyclisierung des PhoB^{DBD}-Proteins eingesetzt.

5.7.1. Darstellung und Immobilisierung der SrtA_{Δ59}-CBD

Zur Darstellung einer immobilisierbaren Mutante wurde mit molekularbiologischen Methoden die SrtA_{Δ59}-Sequenz mit einer C-terminalen Chitin-Bindedomäne (CBD) in den pTWIN2-Vector kloniert. Über die Chitin-Bindedomäne kann die SrtA_{Δ59}-CBD Mutante an Chitin-Beads immobilisiert werden. Die Darstellung und Immobilisierung der Mutante SrtA_{Δ59}-CBD wurde von Christian Bartz im Rahmen seiner Bachelor Arbeit erfolgreich durchgeführt. [112] Die Expression des SrtA_{Δ59}-CBD-Proteins erfolgte analog zur Expression des SrtA_{Δ59}-Proteins ohne CBD, mit dem Unterschied, dass die Selektion durch Ampicillin-haltiges LB-Medium erfolgte (vgl. 5.5.1). Die Bildung des Fusionsproteins während der Expression wurde mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft (Abbildung 5.41). Bereits nach einer Stunde Kultivierung (Spur 1) ist eine basale Expression des SrtA_{Δ59}-CBD-Proteins (23 kDa) durch eine Bande bei ca. 25 kDa gezeigt. Auch in den Proben nach IPTG-Zugabe ist die Expression des Zielproteins durch eine deutliche Bande (~ 25 kDa) bestätigt (Spuren 3-6). Wie bereits für die lösliche SrtA_{Δ59} beschrieben, zeigte auch die immobilisierbare SrtA_{Δ59}-CBD eine abweichende Laufhöhe und dadurch scheinbar eine höhere Masse (vgl. 5.5.1). Dieses Phänomen ist aus der Literatur bekannt. [49,138,139] Da das SrtA_{Δ59}-CBD-Protein über seine Chitin-Bindedomäne immobilisiert werden sollte, wurde das Aufreinigungsprotokoll für Proteine mit Chitin-*tag* (pTWIN2 basierende Plasmide) modifiziert. Dazu wurde das Zellysat auf eine Chromatographiesäule mit Chitin-Beads gegeben und dadurch das Enzym über seinen Chitin-*tag* an die Beads gebunden. Durch Waschen mit AS-Lagerungspuffer konnten anschließend die gebundenen Proteine von der Säule gespült werden. Die Effizienz der Immobilisierung wurde durch SDS-PAGE überprüft. Hierzu wurde eine geringe Menge an Chitin-Beads in AS-Lagerungspuffer für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert, um das gebundene Enzym zu denaturieren und dadurch von den Chitin-Beads zu lösen. Der Überstand wurde anschließend auf das SDS-Gel aufgetragen.

In Spur 7 ist die Probe des Überstandes mit einer stark ausgeprägten Bande bei ~ 25 kDa des SrtA $_{\Delta 59}$ _CBD-Proteins zu sehen (Abbildung 5.41). Mehrere Banden belegen weitere Verunreinigungen, wie denaturierte Sortase-Fragmente oder unspezifisch gebundene Proteine. In der letzten Probe (8) ist das Zellysate aufgetragen. Hier ist deutlich die starke Expression des Fusionsproteins zu erkennen. Das SDS-Gel zeigt die Immobilisierung einer signifikanten Menge an SrtA $_{\Delta 59}$ _CBD.

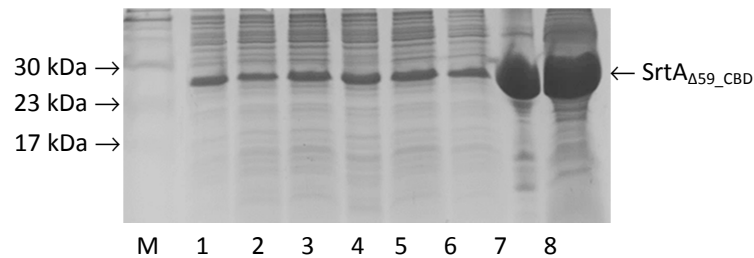


Abbildung 5.41: SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression und Immobilisierung von SrtA $_{\Delta 59}$ _CBD

Die Expression und die Immobilisierung der SrtA $_{\Delta 59}$ _CBD wurden über eine SDS-PAGE kontrolliert. Die Spuren 1 bis 6 zeigen die Expression des Fusionsproteins (~ 25 kDa). In Spur 7 ist das immobilisierte SrtA $_{\Delta 59}$ _CBD-Protein im Überstand nach Abspaltung von den Beads aufgetragen. Spur 8 zeigt das Bakterienlysat. 18 %iges SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie.

Eine Überprüfung auf nicht immobilisiertes Enzym des Überstands erfolgte durch RP-HPLC. Dazu wurden Proben des Überstands von 100 μ L beladenen Beads in einem Gesamtvolumen von 300 μ L (BS-Puffer) ohne und nach 24 h Inkubation bei 37 $^{\circ}$ C analysiert. Beide Proben zeigen einen einzelnen Peak mit einer Retentionszeit von 10,7 min für das Enzym (Abbildung 5.42). Der Vergleich der integrierten Peakflächen belegt keine signifikanten Unterschiede (0 zu 24 h = + 4 %). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass sich zwar Enzym im analysierten Überstand befand, aber der Enzym-Gehalt während der Inkubation konstant blieb.

Eine weitere Analyse des Überstands des immobilisierten Enzyms nach Inkubation per MALDI-ToF-MS bestätigte, dass nicht gebundenes Enzym in der analysierten Probe vorhanden war. Abbildung 5.43 zeigt drei Signale, von denen zwei dem nicht gebundenen Enzym zugeordnet werden können. Der Peak bei $m/z = 17143,51$ wurde einem unvollständigen SrtA $_{\Delta 59}$ _CBD-Protein ohne Chitin-Bindedomäne (AS 1 – 152) oder einem eventuell abgespaltenen Fragment (AS 1 – 152) des immobilisierten Enzyms mit einer theoretischen Masse von $m/z = 17136,41$ $[M+Na]^+$ zugeordnet. Eine PMF-Analyse bestätigte mit dem Fragment [141-152], dass das Enzym ohne Chitin-Bindedomäne (AS 1 – 152) in der Probe enthalten war (Daten im Anhang, Tabelle 8.12).

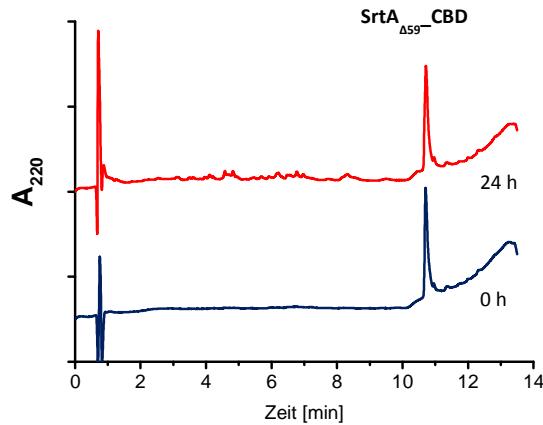
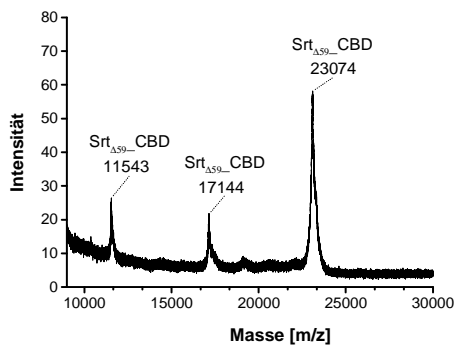


Abbildung 5.42: RP-HPLC-Chromatogramme des Überstands immobilisierter SrtA_{Δ59}_CBD

Die RP-HPLC-Chromatogramme des Überstands immobilisierter SrtA_{Δ59}_CBD nach 0 h und 24 h Inkubationszeit zeigen vergleichbare Peaks mit Retentionszeiten von 10,7 min.



Protein	theor. [m/z]	detekt. [m/z]	
Srt _{Δ59} _CBD	23068,05	23074,37	[M+Na] ⁺
	11545,52	11542,98	[M+2Na] ²⁺
Srt _{Δ59} _CBD (AS 1-152)	17136,41	17143,51	[M+Na] ⁺

Abbildung 5.43: MALDI-ToF-MS-Spektrum des Überstands immobilisierter SrtA_{Δ59}_CBD

Im Überstand immobilisierter SrtA_{Δ59}_CBD konnte das Enzym durch Signale von $m/z = 23074$ [M+Na]⁺ und $m/z = 11543$ [M+2Na]²⁺ nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigt das Spektrum ein Signal bei $m/z = 17144$ [M+Na]⁺, welches dem Enzym ohne CBD (AS 1 – 152) entspricht (Details siehe Text).

Insgesamt konnte zwar eine signifikante Menge des Enzyms an Chitin-Beads immobilisiert werden, die Analyse des Überstands zeigte aber, dass auch nicht immobilisierte SrtA_{Δ59}_CBD und SrtA_{Δ59}_CBD ohne Chitin-Bindedomäne (AS 1 – 152) in den MALDI-ToF-MS Proben enthalten war. Dieses Enzym-Fragment konnte per PMF bestätigt werden. Die Menge an nicht gebundenem Enzym blieb laut RP-HPLC-Ergebnis über eine Inkubation von 24 h konstant.

5.7.2. Ligation von Peptiden mit immobilisierter SrtA_{Δ59}-CBD

Die Aktivität der an Chitin-Beads immobilisierten Sortase A wurde analog zur löslichen Srt_{Δ59} mit den synthetisierten, kurzen Peptiden im RP-HPLC-basierten Assay untersucht (vgl. 5.5.3). Zu diesem Zweck wurde im Reaktionsansatz **r** durch immobilisierte Srt_{Δ59}-CBD das LPETG-Peptid (**2**) mit dem G₂HF-Peptid (**1**) in BS-Puffer mit 5 μM Calciumchlorid umgesetzt. Abbildung 5.44 zeigt die Chromatogramme des Ansatzes **r**, in der die unterste Spur (blau) Peaks der Edukte und des immobilisierten Enzyms zu Beginn der Reaktion (0 h) zeigt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h weisen zwei zusätzliche Peaks in der obersten Spur (rot) auf die Bildung des Ligationsprodukts (**3**) ($t_R = 6,4$ min) und des Peptids **4** ($t_R = 5,6$ min) hin. Über die Abnahme der Fläche des G₂HF-Peaks (**1**) wurde ein Umsatz von 59,3 % für die Testreaktion **r** nach 24 h Reaktionszeit berechnet. Die Bildung der Produkte wurde per MALDI-ToF-MS bestätigt (siehe Anhang, Abbildung 8.9, Tabelle 8.13).

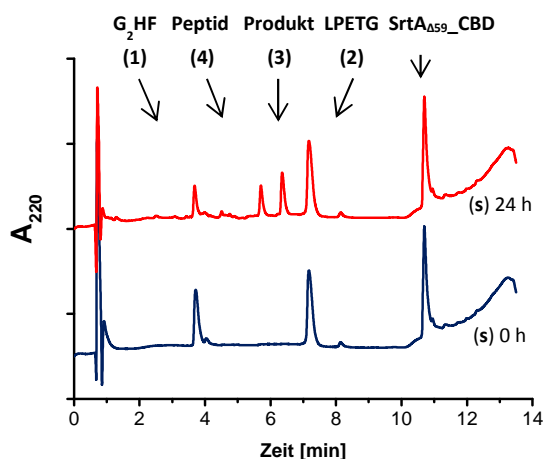


Abbildung 5.44: RP-HPLC-Chromatogramme des Reaktionsansatzes **r** mit immobilisierter Srt_{Δ59}-CBD

RP-HPLC-Chromatogramme des Reaktionsansatzes **r** nach 0 h und 24 h Inkubationszeit. Nach 24 h weisen zwei zusätzliche Peaks mit Retentionszeiten von 5,7 min und 6,4 min auf die Bildung des Peptids **4** und des Ligationsprodukts (**3**) hin.

Im Vergleich zu den Testreaktionen mit der unmodifizierten Sortase A (max. Umsatz ~ 80 %) ist der Umsatz der immobilisierten Variante (~ 60 %) in einem akzeptablen Bereich. Allerdings weisen die Signale des Chromatogramms darauf hin, dass dieser Umsatz nicht nur durch die immobilisierte Sortase, sondern auch einem Anteil an ungebundener Sortase A im Reaktionsansatz geschuldet war. In der aktuellen Literatur wird nur von einem Ansatz berichtet, bei dem Sortase immobilisiert wurde. Hier reduzierte sich der Umsatz von 90 % mit unmodifiziertem Enzym zu 10 % mit immobilisierter Sortase. [83]

5.7.3. Cyclisierung von PhoB^{DBD} mit immobilisierter SrtA_{Δ59}-CBD

Die Ligation der Testpeptide zeigte, dass die an Beads immobilisierte Sortase A aktiv war, aber auch, dass nicht immobilisiertes Enzym zur Ligation beigetragen hat. Zur Cyclisierung wurden daher Enzym-Beads eingesetzt, die frisch immobilisiert und mehrfach mit einem größeren Volumen BS-Puffer und CaCl₂-Zusatz gewaschen wurden, bis kein Enzym im Überstand mehr nachweisbar war. Dies sollte zur besseren Trennung des Enzyms vom Substrat und Produkten aus dem Reaktionsansatz beitragen. Des Weiteren konnte durch das immobilisierte Enzym die Cyclisierung auf einer Chromatographiesäule durchgeführt werden, wobei erneut der Maßstab der Reaktion vergrößert und geringe Konzentrationen des Protein-Substrats eingesetzt wurden. Dementsprechend wurde für die Cyclisierung das MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Protein auf eine Chromatographiesäule appliziert, die mit an Beads immobilisiertem Enzym beladen war, und zur Reaktion für 4 h bei 37 °C inkubiert (Reaktionsansatz s). Die Elutionsfraktionen wurden nach Inkubation mittels MALDI-ToF-MS und SDS-PAGE auf ihre Proteinzusammensetzung hin analysiert. Die MALDI-ToF-MS-Ergebnisse der ersten beiden Elutionsfraktionen zeigten jeweils Signale, die dem vollständigen Enzym und dem beschriebenen Fragment des immobilisierten Enzyms (AS 1 – 152) zugeordnet werden konnten (vgl. Anhang, Abbildung 8.10). Die Spektren der weiteren analysierten Fraktionen (3 – 6) zeigten deutliche Peaks der cyclischen PhoB^{DBD}-Spezies. Das SDS-Gel der Fraktionen zeigt zudem, dass sich in allen Fraktionen nicht immobilisiertes Enzym (~ 25 kDa) und das Fragment des Enzyms (~ 23 kDa) befanden (Abbildung 5.45). Infolgedessen belegt das SDS-Gel, dass durch die Verwendung der immobilisierten Sortase A die Menge des Enzyms zwar reduziert, aber nicht vollständig aus dem Reaktionsansatz entfernt werden konnte (Spur 1 – 6). Es wurde trotz intensiven Waschens der beladenen Beads vor der Reaktion ungebundenes Enzym und das beschriebene Enzym ohne Chitin-Bindedomäne (AS 1 – 152) nachgewiesen. Diese scheinen daher im Verlauf der Reaktion von den Beads abgelöst worden sein. In den Fraktionen 3 und 4 ist jeweils eine weitere, deutliche Bande in Höhe von ~ 20 kDa zuerkennen, welche das cyclische PhoB^{DBD}-Dimer (~ 23 kDa) repräsentiert (Spur 3 und 4). Dieses Cyclisierungsprodukt wurde ebenfalls in den Experimenten mit der löslichen Sortase A beobachtet. Auch unter den hier eingesetzten Parametern erfolgte die intermolekulare Cyclisierung anscheinend bevorzugt gegenüber der intramolekularen Cyclisierung zu einem cyclischen PhoB^{DBD}-Monomer.

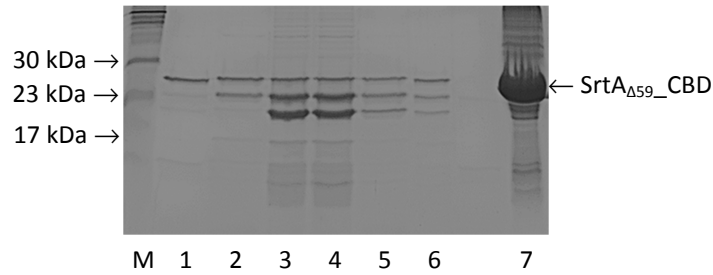


Abbildung 5.45: SDS-PAGE der Cyclisierungsreaktion s von PhoB^{DBD} mit immobilisierter Srt_{Δ59}-CBD

Zur Analyse der Cyclisierungsreaktion s auf einer Chromatographiesäule mit an Beads immobilisiertem Enzym wurden die Elutionsfraktionen 1 – 6 in den gleichnamigen Spuren aufgetragen. Die Banden in den Spuren 1 und 2 zeigen Srt_{Δ59}-CBD (~ 25/ 23 kDa). In den weiteren Spuren (3 – 6) belegt die zusätzliche Bande (~ 20 kDa) die Bildung eines cyclischen PhoB^{DBD}-Dimers. In Spur 7 ist eine Probe der denaturierten Beads aufgetragen, die die gebundenen Proteine zeigt. 18 %iges SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie.

Aufgrund der höheren Mengen an eingesetztem Protein-Substrat im Vergleich zu den Experimenten mit löslicher Sortase war die Größenausschluss-Chromatographie an dieser Stelle geeignet, das Proteingemisch aus Enzym und PhoB^{DBD} der vereinigten Elutionsfraktionen teilweise voneinander zu trennen. Die erhaltenen Fraktionen sind in Abbildung 5.46 dargestellt. Die detektierten Banden stehen in guter Übereinstimmung mit den detektierten Banden der SDS-PAGE in Abbildung 5.45.

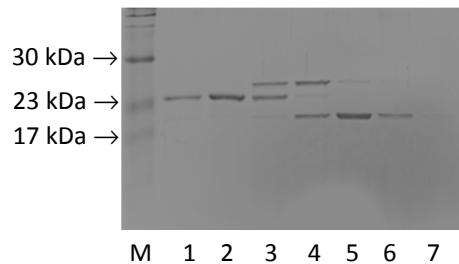


Abbildung 5.46: SDS-PAGE der Größenausschluss-Chromatographie zur Auftrennung des Proteingemisches nach Cyclisierungsreaktion s von PhoB^{DBD} mit immobilisierter Srt_{Δ59}-CBD

Aufgetragen wurden die Elutionsfraktionen 1 – 7, welche eine akzeptable Trennung des Proteingemisches nach Transpeptidierungsreaktion mit immobilisierter Sortase A zeigen. Die Bande in den Spuren 1 und 2 zeigt das Fragment der Srt_{Δ59}-CBD (AS 1 – 152; ~ 23 kDa). In den weiteren Spuren 3 und 4 deuten die zusätzlichen Banden auf das Enzym (~ 25 kDa) und das cyclische PhoB^{DBD}-Dimer (~ 20 kDa) hin. In den Spuren 6 und 7 bestätigt die einzelne Bande (~ 20 kDa) eine erfolgreiche Abtrennung des PhoB^{DBD}-Proteins von dem Enzym. 18 %iges SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie.

In den ersten drei Spuren ist jeweils eine Bande in Höhe von ~ 23 kDa zu erkennen. Die PMF-Analyse dieser Bande identifizierte eindeutig das Enzym (Sequenzübereinstimmung 42,5 %). Unter den detektierten Massen wurde jedoch kein charakteristisches Fragment [141-152] des Enzyms ohne CBD (AS 1 – 152) detektiert (vgl. Anhang, Tabelle 8.14). Allerdings wurde dieses in weiteren PMF-Analysen detektiert und konnte als Sortase A (AS 1 – 152) identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). In den Spuren 3 und 4 ist jeweils eine Bande bei ~ 25 kDa gezeigt, welche ebenfalls per PMF als vollständiges Enzym identifiziert wurde (Sequenzübereinstimmung 39,1 %, Tabelle 8.15).

Aufgrund der vorausgehenden Ergebnisse bezüglich der Bildung des cyclischen Dimers, weist die Bande bei ~ 20 kDa auf dieses Produkt hin. Durch PMF-Analyse dieser Bande konnten drei der detektierten Massen zwar PhoB^{DBD}-Fragmenten zugeordnet werden (Sequenzübereinstimmung 46,4 %), jedoch befand sich darunter kein charakteristisches Fragment für zwei miteinander ligierte PhoB^{DBD}-Proteine (Tabelle 8.16). Somit konnte nur nachgewiesen werden, dass es sich um ein PhoB^{DBD}-Protein in den analysierten Proben handelte. Eine definitive Aussage, dass ein cyclisches Dimer vorlag, kann aufgrund dieser PMF-Ergebnisse nicht getätigt werden.

Insgesamt konnte die Aktivität der immobilisierten Sortase A durch Ligation der Testpeptide nachgewiesen werden. Dabei wurde ein Umsatz von ~ 60 % ermittelt, welcher vermutlich nicht nur durch die immobilisierte Sortase, sondern auch zum Teil durch nicht immobilisiertes Enzym erfolgte. Kontrollen des Überstandes der mit Sortase beladenen Beads gaben Hinweise darauf, dass das Enzym nicht vollständig immobilisiert, bzw. sich während der Reaktion abgelöst haben könnte. Trotz intensiven Waschens der Beads vor der Reaktion, bestätigte sich die Präsenz ungebundener Sortase auch in den Cyclisierungsexperimenten. Somit konnte durch die Immobilisierung der Anteil an Enzym im Reaktionsgemisch zwar gemindert, dieses aber nicht vollständig abgetrennt werden. In den Cyclisierungsexperimenten wurde ebenfalls, wie bereits in den Experimenten mit unmodifiziertem Enzym gezeigt, eine Umsetzung des Protein-Substrats zu ausreichenden Mengen des cyclischen PhoB^{DBD}-Monomers, trotz des Einsatzes größerer Mengen an Protein-Substrat, nicht erreicht. Auch hier wurde die Bildung eines cyclischen Dimers durch eine intermolekulare Transpeptidierung zweier PhoB^{DBD}-Proteine favorisiert.

5.8. Zusammenfassung und Diskussion der Sortase A-vermittelten PhoB^{DBD}-Cyclisierung

Das für die Sortase A-vermittelte Transpeptidierung benötigte Enzym konnte in guten Ausbeuten und hoher Reinheit erfolgreich dargestellt werden. Trotz abweichender Massen in der SDS-PAGE und der MALDI-ToF-MS-Analyse wurde Srt_{Δ59} per PMF eindeutig identifiziert. Das divergente Laufverhalten im SDS-Gel ist aus der Literatur bekannt. [49,138,139] Die detektierte Massendifferenz der MALDI-ToF-MS-Analyse kann dabei durch eine posttranslationale Modifikation durch α -N-Glukonylierung des His-tags der Sortase während der Expression erklärt werden. [140] Die Aktivität des Enzyms wurde durch die Ligation der zwei synthetisierten Peptide mittels RP-HPLC, MALDI-ToF-MS und LC-MS belegt. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte durch den Einsatz eines Überschusses an Glycin-Nukleophil ein Umsatz von $\sim 84\%$ erreicht werden. Unter vergleichbaren Parametern ist dies mit Literaturangaben übereinstimmend. [84] Ein höherer Anteil der Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates wurde unter langen Reaktionszeiten bestätigt. [42] Insgesamt konnte die Transpeptidierungsreaktion mit den Peptiden erfolgreich etabliert werden.

Anschließend wurde das Enzym für die *head-to-tail* Cyclisierung des PhoB^{DBD}-Proteins eingesetzt. Nach der Darstellung des bifunktionellen MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Proteins konnte durch PMF und MALDI-ToF-MS eine partielle *in vivo* Spaltung des Methionins bestätigt werden. Dementsprechend sollte ein N-terminaler Glycinrest als Nukleophil zur intramolekularen Transpeptidierung zur Verfügung stehen. In ersten Experimenten zur Cyclisierung konnte das gewünschte cyclische PhoB^{DBD}-Monomer mittels SDS-PAGE, MALDI-ToF-MS und PMF nachgewiesen werden. Durch die Zuordnung und PMF-Analyse der SDS-Gel-Banden des Reaktionsansatzes **m** konnte die Transpeptidierungsreaktion näher charakterisiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass das Protein-Substrat durch eine intermolekulare Transpeptidierung zu PhoB^{DBD}-Oligomeren und hauptsächlich zu einem cyclischen Dimer umgesetzt wurde. Letzteres wurde aufgrund der starken Ausprägung der Bande im SDS-Gel bevorzugt gebildet. Eine Umsetzung von bifunktionellen Sortase-Substraten zu linearen und cyclischen Oligomeren wurde bereits in der Literatur beschrieben. [79,97,143] Eine unvollständige *in vivo* Spaltung des Methionins, wie in den MALDI-ToF-MS-Analysen des Protein-Substrats gezeigt, könnte zu linearen Oligomeren geführt haben, da ein kein N-terminales Glycin als Nukleophil für eine Cyclisierung zur Verfügung stand. Diese linearen PhoB^{DBD}-Spezies konnten durch entsprechende Banden in SDS-Gelen beobachtet und teilweise per PMF bestätigt werden.

In Bezug auf die Bildung des cyclischen PhoB^{DBD}-Dimers konnten die Peaks der MALDI-ToF-MS Spektren neu interpretiert werden. Das ursprünglich dem cyclischen Monomer zugeordnete Signal stimmt auch mit $[M+2Na]^{2+}$ -Signal des cyclischen Dimers überein. Demzufolge kann ein Signal bei $m/z = 11518$ zwar einer cyclischen PhoB^{DBD}-Spezies zugeordnet werden, jedoch ist eine Differenzierung zwischen einem cyclischen Monomer oder cyclischem Dimer anhand dieser Daten nicht möglich. Ein Ansatz zur eindeutigen Differenzierung der verschiedenen PhoB^{DBD}-Spezies könnte eine Analyse per Western Blot der im SDS-Gel detektierten Banden erbringen. Diesbezüglich würde der Einsatz eines Anti-His-Antikörpers die linearen PhoB^{DBD}-Proteine und auch die Sortase A identifizieren. Im Fall des Protein-Substrats und auch linearer Oligomere weisen diese den C-terminalen His-*tag* auf. Bei cyclischen PhoB^{DBD}-Proteinen hingegen ist der N- und C-terminus miteinander ligiert und somit der His-*tag* entfernt. In Folge dessen könnte zwischen linearen und cyclischen PhoB^{DBD}-Proteinen unterschieden werden.

Aufgrund der geringen Ausbeute an cyclischem Zielprotein wurde durch Variation der Konzentrationen an Enzym und MG₂A_PhoB^{DBD}-Protein versucht, den Umsatz zum cyclischen Zielprotein zu optimieren. Zu diesem Zweck wurde auch die Reinheit des Protein-Substrats durch vorherige Größenausschluss-Chromatographie erhöht. Eine Konzentration des Protein-Substrats von 40 µM war aus Gründen der Löslichkeit limitierend. Alle Variationen der verschiedenen Parameter führten jedoch nicht zu einem höheren Umsatz des gewünschten cyclischen Monomers. Da die Proben verschiedener Reaktionsansätze im SDS-Gel bei der erwarteten Läuflhöhe der Zielproteins erstens disperse Banden des Eduktes aufwiesen und zweitens PMF-Proben dieser Bereiche das lineare sowie das cyclische PhoB^{DBD}-Protein bestätigten, wurde eine Abtrennung des cyclischen PhoB^{DBD}-Monomers durch den Einsatz von HisTalon-Beads getestet. Im Gegensatz zu den cyclisierten Proteinen werden die linearen PhoB^{DBD}-Proteine sowie das Enzym über ihren His-*tag* an die Beads gebunden und konnten somit aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Bedingt durch die geringen Ausbeuten an Zielprotein war der Einsatz von HisTalon-Beads nicht erfolgreich. Auch der Versuch, die Ausbeute an cyclischem PhoB^{DBD}-Monomer über einen größeren Reaktionsansatz und eine geringere Konzentration des Substrat-Proteins zu erhöhen, führte nicht zu einer Erhöhung der Ausbeute an cyclischem Monomer.

Der Einsatz einer immobilisierbaren Variante des Enzyms hätte eine Trennung der Sortase aus dem Reaktionsansatz ermöglichen sollen. Die Aktivität der immobilisierten Sortase A konnte durch Ligation der Testpeptide nachgewiesen werden. Dabei wurde ein Umsatz von ~ 60 % ermittelt, welcher aber vermutlich nicht nur durch die immobilisierte Sortase, sondern auch zum Teil durch nicht immobilisiertes Enzym erfolgt ist.

Problematisch an der Immobilisierung war, dass MALDI-ToF-MS-Analysen von Überständen der an Beads immobilisierten Sortase A zeigten, dass nicht immobilisiertes Enzym und Enzym ohne CBD dieser in den Proben vorhanden war. Laut RP-HPLC-Untersuchung blieb der Enzymgehalt des Überstands jedoch während der Inkubation konstant. Zwar wurde durch intensives Waschen der Beads vor den Reaktionen nicht immobilisiertes Enzym entfernt, jedoch scheint ein Ablösen des Enzyms von den Beads während einer Inkubation erfolgt zu sein, wie in den Cyclisierungsreaktionen bestätigt.

Die Cyclisierung von PhoB^{DBD} mit immobilisierter Sortase A wurde im größeren Maßstab auf einer Chromatographiesäule durchgeführt. Die Reaktionskontrollen per MALDI-ToF-MS bestätigten Peaks, die dem Enzym und PhoB^{DBD}-Proteinen, darunter cyclisierte PhoB^{DBD}-Spezies, zugeordnet werden konnten. Durch entsprechende Banden der SDS-PAGE wurde deutlich, dass auch nicht immobilisiertes Enzym und Enzym ohne CBD in den Elutionsfraktionen enthalten waren. Somit konnte die Verwendung der immobilisierten Sortase A nicht dazu beitragen, dass Enzym vollständig aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Auch in diesen Cyclisierungsversuchen wurde eine Bande bei ~ 20 kDa im SDS-Gel detektiert, welche das cyclische PhoB^{DBD}-Dimer kennzeichnet. Die PMF-Analyse der durch Größenausschluss-Chromatographie aufgetrennten Proteine bestätigte zwar PhoB^{DBD}-Fragmente in der korrespondierenden Bande, jedoch konnte das cyclische PhoB^{DBD}-Dimer nicht definitiv identifiziert werden. Analog zur löslichen Sortase war auch bei der Transpeptidierungsreaktion mit immobilisiertem Enzym eine intermolekulare Transpeptidierung zum cyclischen Dimer anscheinend begünstigt. Dementsprechend wurde auch bei dem Einsatz der immobilisierten Sortase das Ziel, die Darstellung eines cyclischen PhoB^{DBD}-Monomers nicht erreicht.

6. Zusammenfassung

Interaktionen zwischen Proteinen und DNA sind essentiell für die Regulierung grundlegender biologischer Prozesse, unter anderem die Genexpression und DNA-Replikation. Um ein besseres Verständnis der komplexen Mechanismen der spezifischen Wechselwirkung zwischen Proteinen und DNA zu erlangen, wurde in dieser Arbeit die DNA-bindende Domäne (DBD) des Transkriptionsfaktors PhoB aus *E. coli* als Modell-System eingesetzt. Die DBD eignet sich aufgrund der spezifischen Wechselwirkung mit der *pho box*-DNA zur Analyse zugrunde liegender Protein-DNA-Interaktionen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden durch den Einsatz von PhoB^{DBD}-Punktmutanten die Beiträge der Interaktionen einzelner Aminosäureseitenketten auf die DNA-Bindung quantifiziert. Dazu wurde ein Alaninscan von vier Aminosäuren des PhoB^{DBD}-Proteins durchgeführt. Hierfür wurden Glu159, Trp184, Glu191 und Arg200 mutiert, die laut Strukturanalyse spezifisch das TGTCA-Erkennungsmotiv der *pho box*-DNA adressieren. Die Bestimmung der Anteile an Sekundärstrukturelementen mittels CD-Spektroskopie bestätigte eine gute Übereinstimmung der Konformationen aller untersuchten PhoB^{DBD}-Proteine. Eine veränderte Interaktion der Mutanten mit der DNA resultiert infolge dessen nicht aus einer abweichenden Sekundärstruktur, sondern aus der Deletion der entsprechenden Aminosäureseitenkette und deren fehlender Wechselwirkung. Des Weiteren wurde mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen, dass die hergestellten Mutanten, trotz veränderter Primärstruktur, eine spezifische Bindung an das TGTCA-Motiv aufweisen. Somit ist der Verlust der Interaktionen der jeweiligen Aminosäure für die DNA-Bindung nicht essentiell.

Die Affinität der DNA-Bindung der einzelnen Mutanten konnte anschließend durch quantitative Analyse der Interaktionen mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) verifiziert werden. Durch die Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D) konnten die einzelnen Beiträge der Aminosäureseitenketten zur Protein-DNA-Interaktionen genauer beschrieben und die Stabilität verschiedener PhoB-DNA-Komplexe gegenübergestellt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutanten PhoB^{DBD}_W184A und PhoB^{DBD}_R200A eine zum Wildtyp vergleichbare Affinität aufweisen. Im Gegensatz dazu zeichnet die Mutanten PhoB^{DBD}_E159A und PhoB^{DBD}_E191A eine Reduktion der K_D -Werte aus.

Insbesondere PhoB^{DBD}_E159A ist durch eine signifikant höhere Affinität zur *pho box*-DNA bei der Interaktionsanalyse charakterisiert. Im Kontext der Strukturaufklärung des PhoB^{DBD}-DNA-Komplexes interagiert die Seitenkette der Glutaminsäure Glu159 über zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Phosphatrückgrat der TGTCA-Sequenz. Darüber hinaus wechselwirkt Glu159 auch intramolekular mit His198 des PhoB^{DBD}-Proteins, wodurch die α^1 - und α^3 -Helix des Proteins miteinander interagieren. Der Verlust dieser Wechselwirkung führt zu einer erhöhten Flexibilität des Proteins, was im Gegenzug eine verringerte konformationelle Stabilität zur Folge hat. Diese konnte durch eine niedrigere Denaturierungstemperatur im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein nachgewiesen werden. Letztendlich konnte aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob die erhöhte Affinität der DNA-Bindung dieser Mutante durch den Verlust der spezifischen DNA-Interaktion der korrespondierenden Aminosäureseitenkette und/oder der erhöhten Flexibilität durch die fehlende intramolekulare Wechselwirkung geschuldet ist. Hierfür müssten in weiterführenden Experimenten geeignete Mutanten eingesetzt werden, um zwischen den beiden Interaktionsarten differenzieren zu können.

Die zur Interaktionsanalyse eingesetzte **MmMm**-DNA umfasst zwei komplette Bindestellen für PhoB^{DBD}, jeweils bestehend aus dem TGTCA-Erkennungsmotiv der großen Furche (**M** = *Major groove*) gefolgt von der A/T-reichen Sequenz der kleinen Furche (**m** = *minor groove*). Obwohl zwei PhoB^{DBD}-Proteine die MmMm-DNA in einem heterotrimeren Komplex binden, konnten bei den Interaktionsanalysen per SPR nur durch die Verwendung eines 1:1-Bindemodells verlässliche Daten generiert werden. Dies ist durch einen positiv kooperativen Bindemechanismus begründet, welcher durch die Bestimmung des Hill-Koeffizienten bestätigt werden konnte. Demzufolge erhöht die Bindung des ersten PhoB^{DBD} die Affinität der Bindung des zweiten Proteins deutlich. Ferner konnte durch den Vergleich der K_D -Werte der Interaktionsanalyse von Oligonukleotiden mit einer und mit zwei vollständigen Bindestellen verifiziert werden, dass zwei PhoB^{DBD}-Proteine durch Protein-Protein-Wechselwirkungen zur Stabilität des heterotrimeren Komplexes beitragen.

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war die Sortase A-vermittelte Cyclisierung von PhoB^{DBD}. Aufgrund der cyclischen Konformation sollte das modulierte PhoB^{DBD}-Protein auf seine thermische Stabilität und DNA-bindenden Eigenschaften charakterisiert werden. Nach der erfolgreichen Herstellung der Sortase A wurde die Aktivität durch die Ligation von zwei synthetisierten, kurzen Peptiden durch einem RP-HLPC-basierten Assay, MALDI-ToF-MS und LC-MS bestätigt. In diesem Kontext konnte durch optimierte Reaktionsbedingungen, unter anderem durch den Einsatz eines Überschusses an Glycin-Nukleophil, ein maximaler Umsatz von ~84 % erreicht werden. Als eine Nebenreaktion der Transpeptidierung ist die

Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates bekannt, diese war geringfügig unter langen Inkubationszeiten zu beobachten. Somit konnte abschließend die Transpeptidierungsreaktion mit Hilfe der Testpeptide erfolgreich etabliert werden.

Für die Cyclisierung von PhoB^{DBD} wurde eine bifunktionelle Mutante des Proteins als Sortase A-Substrat mit einem C-terminalem LPSTG-Motiv und N-terminalem Glycinrest erfolgreich dargestellt. In initialen Experimenten zur Cyclisierung konnte das cyclische PhoB^{DBD}-Monomer zwar nachgewiesen werden, jedoch erfolgte die Bildung des Zielproteins in nur geringen Ausbeuten. Eine Charakterisierung der Reaktionsprodukte mittels SDS-PAGE und PMF zeigte zudem, dass durch intermolekulare Transpeptidierung Nebenprodukte wie lineare und cyclische PhoB^{DBD}-Oligomere entstanden sind. Diesbezüglich scheint die Bildung eines cyclischen Dimers durch intermolekulare Transpeptidierung zweier PhoB^{DBD}-Proteine favorisiert und der Bildung des gewünschten cyclischen Monomers entgegen zu stehen. Aufgrund der geringen Ausbeute an cyclischem PhoB^{DBD}-Monomer wurde über Variationen der Reaktanden-Konzentrationen versucht, konkurrierende Reaktionswege in Richtung einer intramolekularen Cyclisierung des PhoB^{DBD}-Proteins zu optimieren. Dies führte jedoch nicht zu einer Erhöhung der Ausbeute an cyclischem PhoB^{DBD}-Monomer. Ebenso scheiterte der Ansatz, die Ausbeute dieses über einen größeren Reaktionsansatz und einer geringeren Konzentration des Substrat-Proteins zu steigern.

Eine über eine Chitin-Bindedomäne an Chitin immobilisierbare Variante der Sortase A zeigte sich in Ligationsreaktionen mit Testpeptiden als aktiv, konnte aber die gewünschte vollständige Trennung des Enzyms aus dem Reaktionsansatz nicht ermöglichen. In den Cyclisierungsexperimenten mit immobilisierter Sortase A konnte, wie bei der Verwendung von freiem Enzym, lediglich eine geringe Umsetzung von PhoB^{DBD} zum cyclischen PhoB^{DBD}-Monomer erreicht werden. Auch hier wurde laut SDS-PAGE die Bildung eines cyclischen Dimers durch eine intermolekulare Transpeptidierung zweier PhoB^{DBD}-Proteine favorisiert. Insgesamt war die Sortase A-vermittelte Transpeptidierung zur Ligation der Testpeptide und zur Cyclisierung von PhoB^{DBD} erfolgreich. Jedoch war aufgrund der geringen Ausbeuten keine Charakterisierung des Proteins in Bezug auf thermische Stabilität und DNA-bindenden Eigenschaften möglich.

7. Abstract

Interactions between proteins and DNA are essential for a variety of biological processes, including gene expression and DNA replication. To gain a better understanding of the complex mechanism of the specific interaction between proteins and DNA, the DNA binding domain (DBD) of the transcription factor PhoB from *E. coli* was used as a model system. Due to its interaction with the *pho box* DNA the DBD is well suited for analysis of underlying protein-DNA interactions.

In the first part of this thesis the contributions of interactions of individual amino acids to DNA binding were quantified by the use of PhoB^{DBD} point mutants. In this context an alanine scan of four residues of the PhoB^{DBD} protein was carried out. The interactions of residues Glu159, Trp184, Glu191 and Arg200 are known to address the TGTCA-recognition motif according to structural analysis. Secondary structure estimation by means of CD spectroscopy confirmed a good agreement between the conformations of all investigated PhoB^{DBD} proteins. Consequently, a difference in DNA interaction of the mutants is not caused by changed secondary structure, but by deletion of corresponding residues and their interaction. It was further confirmed via CD spectroscopy that all mutants exhibit a specific binding to the TGTCA-motif despite the altered primary structure and thus the loss of interaction of the corresponding residues is not essential for DNA binding.

The affinity to the *pho box* DNA of generated mutants was verified by quantitative determination of the interactions using surface plasmon resonance (SPR). The contribution of individual residues to protein-DNA interaction could be described in detail through calculation of equilibrium dissociation constants (K_D) and thereby the stability of various PhoB^{DBD}-DNA complexes was compared. The results of the interaction analysis indicate that the mutants PhoB^{DBD}_W184A and PhoB^{DBD}_R200A show a similar affinity compared to the wild type. In contrast, the mutants PhoB^{DBD}_E159A and PhoB^{DBD}_E191A represent reduced K_D values.

Remarkably, PhoB^{DBD}_E159A is characterized by a significantly higher affinity to the *pho box*. Based on the PhoB^{DBD}-DNA complex structure, the side chain of glutamic acid Glu159 interacts through two hydrogen bonds with the phosphate backbone of the TGTCA sequence. Additionally Glu159 interacts intramolecularly with His198 of PhoB^{DBD}, which

leads to an interaction of the α 1- and α 3-helix of the protein. The loss of this interaction results in a higher flexibility of the protein, which leads accordingly to a reduced conformational stability. This was demonstrated by a lower denaturation temperature in comparison with the wild type protein. Finally it remained unclear due to the results of this work, whether the cause of the increased DNA binding affinity of this mutant is due to the loss of the specific DNA interaction of the corresponding residue and/or the increased flexibility due to the lack of intramolecular interaction. It would require further experiments in which suitable mutants will be used to differentiate between the two types of interaction. The **MmMm**-DNA for the interaction analysis comprises two complete binding sites for PhoB^{DBD}, each consisting of the TGTCA-recognition motif of the major groove (**M**), followed by the A/T-rich sequence of the minor groove (**m**). Generating reliable data of the SPR interaction studies was only possible using a one-site binding model, although the oligonucleotide sequence of the analyzed MmMm-DNA contains two complete binding sites for PhoB^{DBD}. The reason for this behavior is a positively cooperative binding mechanism, which has been confirmed by the determination of the Hill coefficient. Thus, the binding of the first protein increases considerably the binding affinity of the second one. Furthermore, comparing the K_D values of oligonucleotides with one and with two complete binding sites conformed that the contribution of two PhoB^{DBD} proteins to the specific DNA binding, increasing the stability of the heterotrimeric complex by protein-protein interactions.

The aim of the second part of this thesis was the sortase A-mediated cyclization of PhoB^{DBD}, which should be characterized with respect to thermal stability and DNA-binding properties. After successful preparation of sortase A, its activity was studied systematically in test reactions with short synthetic peptides by a HPLC-based assay, MALDI-ToF-MS and LC-MS. In this context the transpeptidation was optimized, e. g. by using an excess of glycine nucleophile, a maximum conversion of $\sim 84\%$ could be achieved. As a side reaction of the transpeptidation the hydrolysis of the acyl-enzyme intermediate is known, but it was only observed at long incubation times. Finally, the transpeptidation could be successfully established using test peptides.

For cyclisation of PhoB^{DBD}, a bifunctional mutant was successfully prepared, which contains a C-terminal LPSTG-motif and N-terminal glycine residue as substrate for sortase A. In initial experiments, the cyclization of the desired cyclic PhoB^{DBD} monomer was demonstrated, but the target protein was only formed in low yields. A characterization of the reaction products showed that by-products as linear and cyclic oligomers PhoB^{DBD} were generated, caused by intermolecular transpeptidation. In this respect the formation of the cyclic dimer by an intermolecular transpeptidation two PhoB^{DBD} proteins seems to be favored, opposed to the

formation of the desired cyclic monomer. The cyclization had to be optimized due to the low yields of cyclic monomer. For this purpose, different concentrations of the reactants were tested to optimize the competing pathways in the direction of an intramolecular cyclization of the PhoB^{DBD}. Overall these attempts did not lead to higher yields of cyclic monomer PhoB^{DBD}. In addition, a higher batch volume and lower concentration of the substrate protein also did not succeed.

An immobilized variant of sortase A using a chitin binding domain was active to ligate test peptides. Unfortunately, the immobilized enzyme did not afford complete separation from the reaction mixture. Using immobilized enzyme for the cyclization of PhoB^{DBD} was not successful to get sufficient yield of cyclic PhoB^{DBD} monomer, comparable to experiments with unmodified enzyme. Again, the formation of a cyclic dimer by an intermolecular transpeptidation of two PhoB^{DBD} proteins was favored as shown by SDS-PAGE analysis. In conclusion, the formation of the cyclic PhoB^{DBD} monomer was successfully demonstrated, but a characterization of its thermal stability and DNA-binding properties could not be performed due to low reaction yields by sortase A-mediated cyclization.

8. Anhang

8.1. CD- und SPR-Spektren

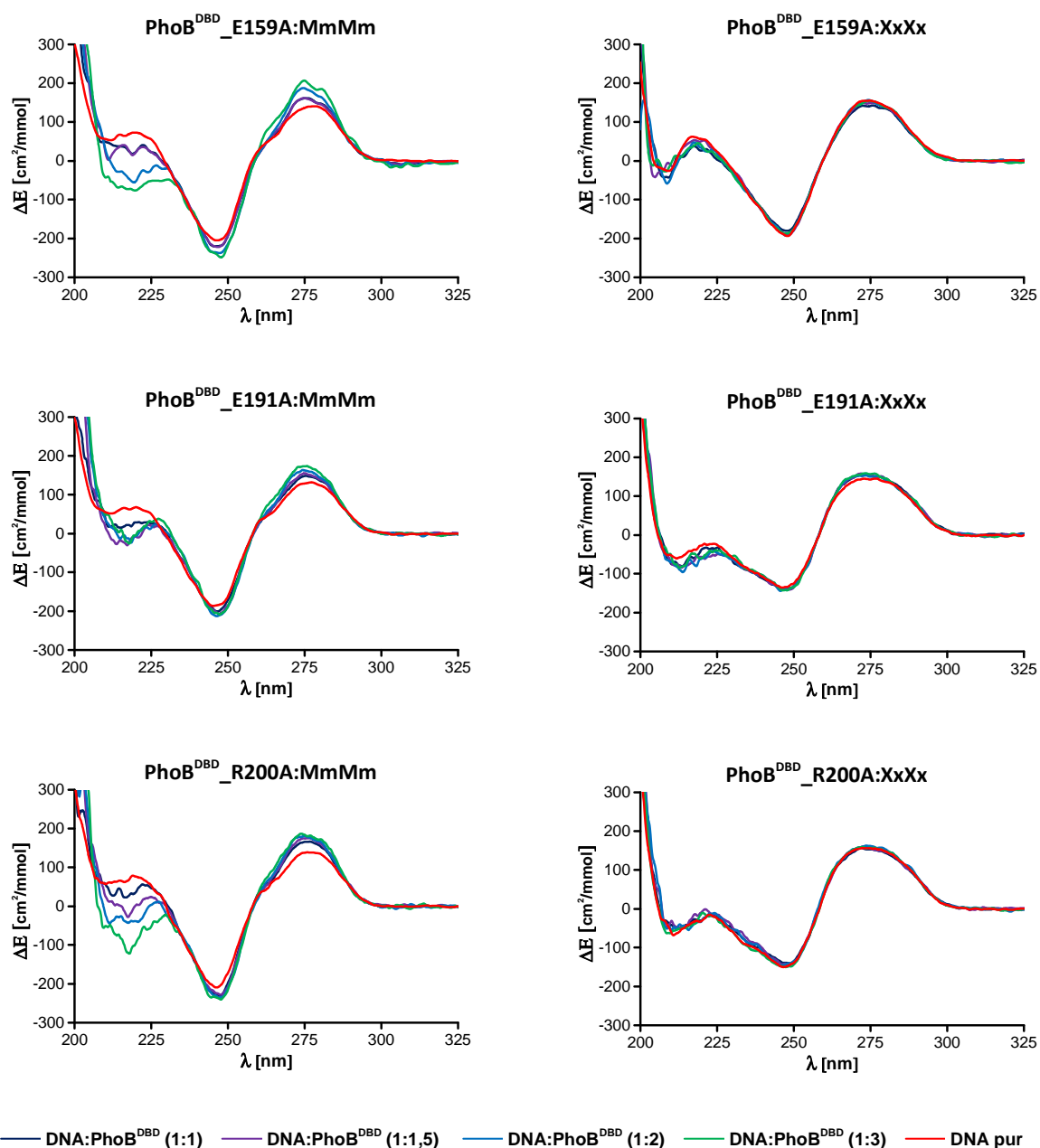


Abbildung 8.1: CD-Spektren der Protein-DNA-Bindung verschiedener PhoB^{DBD}- Mutanten

Interaktionen der PhoB^{DBD}-Mutanten mit der MmMm-DNA oder XxXx-DNA bei verschiedenen Protein/ DNA-Verhältnissen. Das unten gezeigte Farbschema der Verhältnisse gilt für alle Spektren. Die jeweilige PhoB^{DBD}-Mutante ist den einzelnen Überschriften der Spektren zu entnehmen.

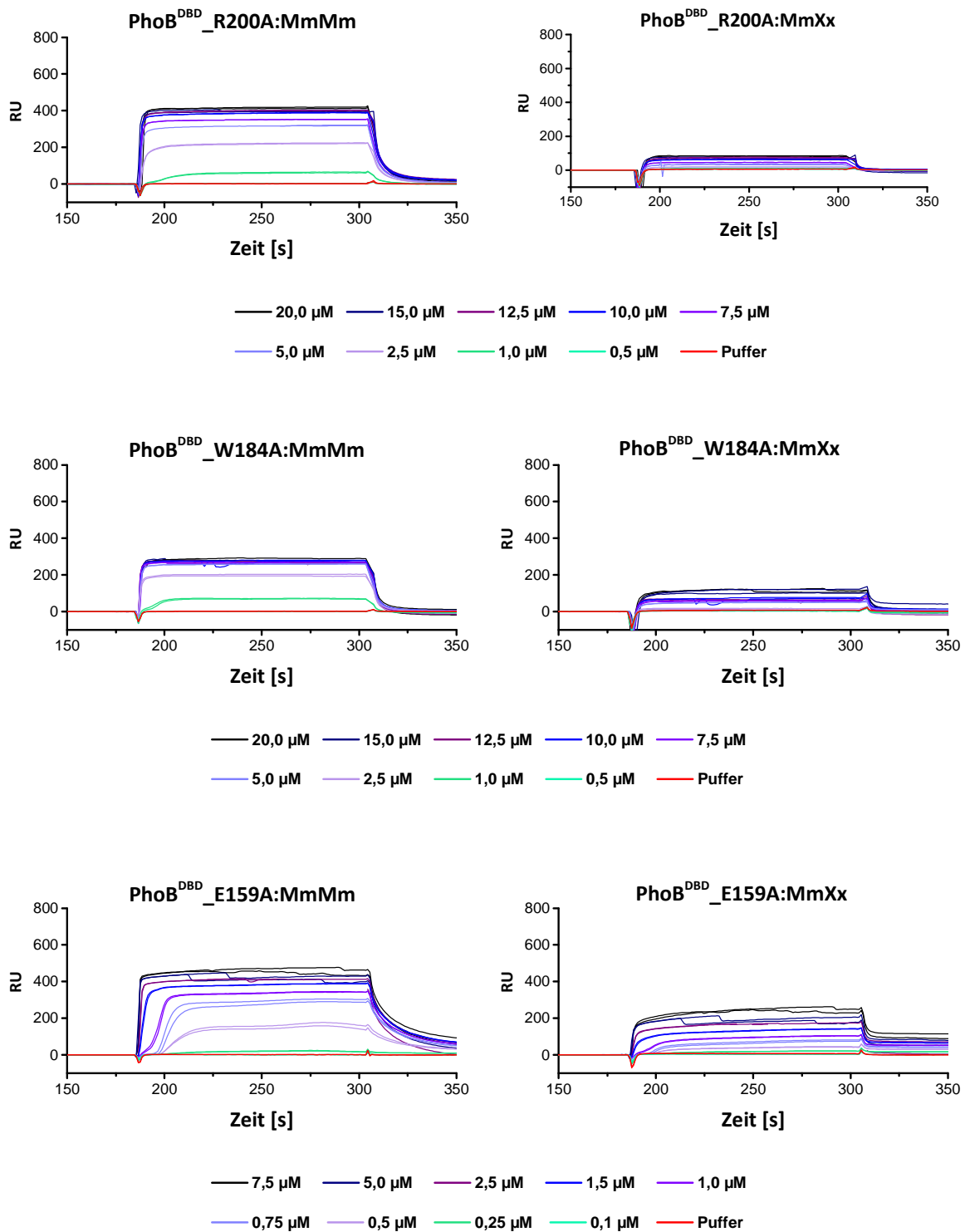


Abbildung 8.2: SPR-Spektren der Protein-DNA Interaktionen verschiedener PhoB^{DBD}- Mutanten

Interaktionen der PhoB^{DBD}-Mutanten mit der MmMm-DNA oder MmXx-DNA. Die jeweilige Mutante ist den einzelnen Überschriften der Spektren zu entnehmen. Gezeigt sind in Doppelbestimmung gemessene Differenzsensogramme. Die vermessenen Konzentrationen der Proteine sind der Legende zu entnehmen.

8.2. Spektren und Daten der SML

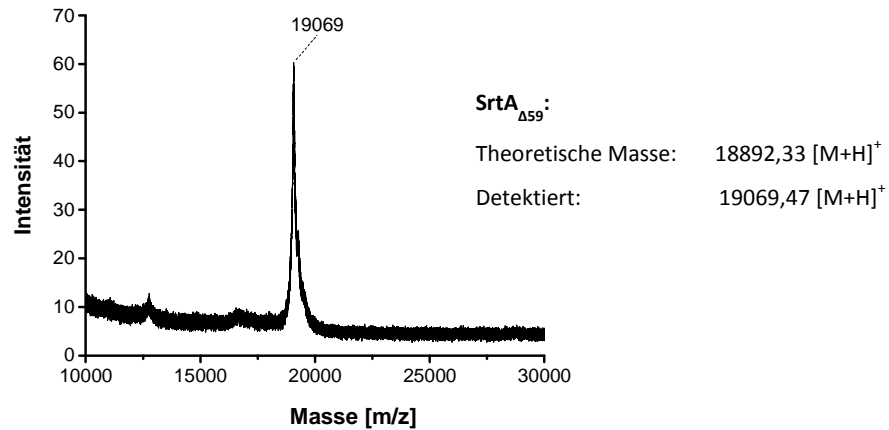
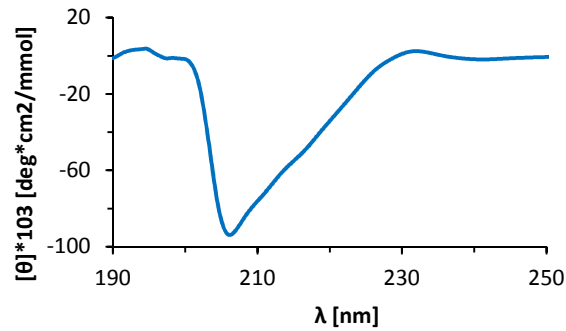


Abbildung 8.3: MALDI-ToF-MS Analyse der aufgereinigten Sortase A (SrtA_{Δ59})

Tabelle 8.1: Ergebnisse der PMF-Analyse nach tryptischem Verdau von SrtA_{Δ59}

Die PMF-Analyse bestätigt die Massen von 19 Fragmenten für SrtA_{Δ59} mit einer Sequenzübereinstimmung von 85,7 %.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
607,25	607,32	-119,7	11,75	[117-121] k.MTSIR.d	C ₂₄ H ₄₆ N ₈ O ₈ S
675,29	675,34	-71,4	24,08	[108-113] k.VGNETR.k	C ₂₆ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₁
719,33	719,37	-55,9	61,23	[153-158] k.TGVWEK.r	C ₃₃ H ₅₀ N ₈ O ₁₀
803,42	803,44	-21,7	4,29	[108-114] k.VGNETR.k.y	C ₃₂ H ₅₈ N ₁₂ O ₁₂
831,39	831,41	-23,9	6,78	[101-107] k.GSMVYFK.v	C ₃₉ H ₅₈ N ₈ O ₁₀ S
875,47	875,47	-6,7	11,29	[153-159] k.TGVWEKR.k	C ₃₉ H ₆₂ N ₁₂ O ₁₁
906,53	906,53	3,9	35,34	[161-168] k.IFVATEVK.	C ₄₃ H ₇₁ N ₉ O ₁₂
959,51	959,50	9,2	8,60	[100-107] k.KGSMVYFK.v	C ₄₅ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₁ S
1034,64	1034,62	10,1	2,65	[160-168] r.KIFVATEVK.	C ₄₉ H ₈₃ N ₁₁ O ₁₃
1403,79	1403,74	31,0	0,67	[34-46] k.VAGYIEIPDADIK.e	C ₆₄ H ₁₀₂ N ₁₄ O ₂₁
1542,86	1542,80	38,3	9,11	[122-135] r.DVKPTDVGVLDEQK.g	C ₆₆ H ₁₁₁ N ₁₇ O ₂₅
1555,79	1555,73	39,1	2,23	[140-152] k.QLTLITCDDYNEK.t	C ₆₆ H ₁₀₆ N ₁₆ O ₂₅ S
1564,85	1564,83	17,8	0,89	[18-31] r.GSHMQAKPQIPKDK.s	C ₆₇ H ₁₁₃ N ₂₁ O ₂₀ S
1667,89	1667,84	29,0	2,21	[47-61] k.EPVYGPATPEQLNR.g	C ₇₄ H ₁₁₄ N ₂₀ O ₂₄
1727,97	1727,92	31,9	4,62	[122-137] r.DVKPTDVGVLDEQK.d	C ₇₄ H ₁₂₆ N ₂₀ O ₂₇
1798,89	1798,85	23,3	0,24	[138-152] k.DKQLTLITCDDYNEK.t	C ₇₆ H ₁₂₃ N ₁₉ O ₂₉ S
2131,14	2131,11	16,5	0,24	[117-135] k.MTSIRDVKPTDVGVLDEQK.g	C ₉₀ H ₁₅₅ N ₂₅ O ₃₂ S
3052,63	3052,56	23,1	67,45	[34-61] k.VAGYIEIPDADIKEPVYGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄
3969,87	3969,89	-4,2	40,26	[62-96] r.GVSFAEENESLDDQNISIAGHTFIDRPNYQ FTNLK.a	C ₁₇₄ H ₂₆₁ N ₄₇ O ₆₀

Abbildung 8.4: CD-Spektrum der SrtA_{Δ59}

Zur Kontrolle der Sekundärstruktur wurde die Sortase A mit Hilfe von CD analysiert.

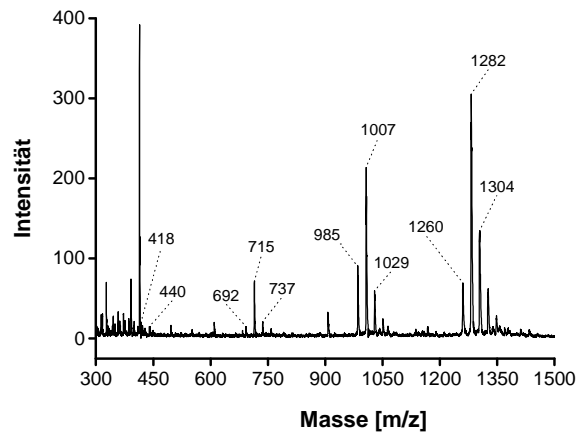


Abbildung 8.5: MALDI-ToF-MS-Spektrum der SML-Testreaktion a nach 6 h Inkubation

Tabelle 8.2: Übersicht der monoisotopischen, theoretischen und detektierten Massen der MALDI-ToF-MS Analyse der SML-Testreaktion a nach 6 h Inkubation

Edukte	theor. [m/z]	detekt. [m/z]		Produkte	theor. [m/z]	detekt. [m/z]	
LPETG-Peptid (2)	1260,58	1260,19	[M+H] ⁺	Peptid (3)	985,48	985,02	[M+H] ⁺
	1282,56	1282,06	[M+Na] ⁺		1007,46	1006,98	[M+Na] ⁺
	1298,65	-	[M+K] ⁺		1023,55	-	[M+K] ⁺
	1305,55	1304,12	[M+2Na-H] ⁺		1030,45	1028,97	[M+2Na-H] ⁺
G ₂ HF-Peptid (1)	417,19	418,03	[M+H] ⁺	Peptid (4)	692,29	692,27	[M+H] ⁺
	439,17	439,75	[M+Na] ⁺		714,27	714,54	[M+Na] ⁺
	455,26	-	[M+K] ⁺		730,36	-	[M+K] ⁺
	462,16	-	[M+2Na-H] ⁺		737,26	736,54	[M+2Na-H] ⁺

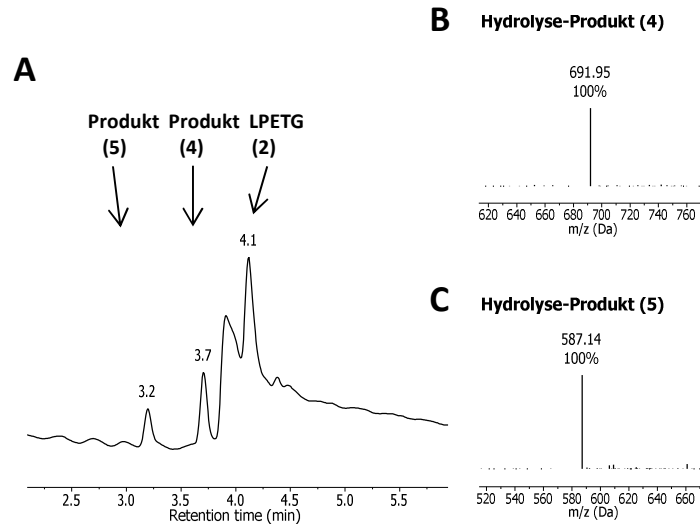


Abbildung 8.6: LC-MS-Analyse des Reaktionsansatzes e

A Chromatogramm des Reaktionsansatzes **e** nach 24 h Inkubation. **B** Der Peak bei 3,7 min konnte durch das Massenspektrum dieses Peaks dem Hydrolyse-Produkt **4** zugeordnet werden. **C** Der Peak bei 3,2 min entspricht laut Massenspektrum dem Hydrolyse-Produkt **5**.

Tabelle 8.3: PMF-Analyse der Probe 1 des Cyclisierungsansatzes m

Die PMF-Analyse bestätigt Massen der Fragmente für das PhoB^{DBD}-Protein und für Srt_{Δ59}. (Charakteristisches Fragment ist in rot markiert). Die Sequenzübereinstimmung beträgt für PhoB^{DBD} 40,0 %.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
PhoB^{DBD}-Fragmente					
1821,73	1821,83	-53,80	3,30	[95-110] r.GTGYLPSTGF HHHHHHH .	C ₈₂ H ₁₀₈ N ₂₈ O ₂₁
2071,93	2072,02	-43,70	55,46	[52-68] r.EQLLNHVWGTNVYVEDR.t	C ₉₂ H ₁₃₈ N ₂₆ O ₂₉
2577,07	2577,28	-84,30	0,44	[48-68] r.VYSREQLLNHVWGTNVYVEDR.t	C ₁₁₅ H ₁₇₃ N ₃₃ O ₃₅
2892,21	2892,48	-92,50	0,35	[52-75] r.EQLLNHVWGTNVYVEDRTVDVHIR.r	C ₁₂₈ H ₁₉₈ N ₃₈ O ₃₉
Srt_{Δ59}-Fragmente					
3052,40	3052,56	-54,8	0,51	[34-61] k.VAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄

Tabelle 8.4: PMF-Analyse der Probe 2 des Cyclisierungsansatzes mDie PMF-Analyse bestätigt Massen für Fragmente der Srt_{Δ59} mit einer Sequenzübereinstimmung von 57,1 %.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
Srt_{Δ59}-Fragmente					
675,25	675,34	-138,0	0,36	[108-113] k.VGNETR.k	C ₂₆ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₁
719,32	719,37	-76,1	0,44	[153-158] k.TGVWEK.r	C ₃₃ H ₅₀ N ₈ O ₁₀
906,42	906,53	-119,9	0,3	[161-168] k.IFVATEVK.	C ₄₃ H ₇₁ N ₉ O ₁₂
1555,61	1555,73	-75,3	0,09	[140-152] k.QLTLITCDDYNEK.t	C ₆₆ H ₁₀₆ N ₁₆ O ₂₅ S
3052,32	3052,56	-80,1	40,1	[34-61] k.VAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄
3970,49	3969,89	151,4	51,44	[62-96] r.GVSFAEENESLDDQNIAGHTFIDRPNYQFTNLK.a	C ₁₇₄ H ₂₆₁ N ₄₇ O ₆₀

Tabelle 8.5: PMF-Analyse der Probe 3 des Cyclisierungsansatzes mDie PMF-Analyse bestätigt Massen für Fragmente der Srt_{Δ59} mit einer Sequenzübereinstimmung von 39,3 %.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
Srt_{Δ59}-Fragmente					
3052,33	3052,56	-76,7	23,42	[34-61] k.VAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄
3969,58	3969,89	-79,0	9,22	[62-96] r.GVSFAEENESLDDQNIAGHTFIDRPNYQFTNLK.a	C ₁₇₄ H ₂₆₁ N ₄₇ O ₆₀
4239,73	4240,06	-78,2	0,11	[62-99] r.GVSFAEENESLDDQNIAGHTFIDRPNYQFTNLKAAK.k	C ₁₈₆ H ₂₈₃ N ₅₁ O ₆₃

Tabelle 8.6: PMF-Analyse der Probe 4 des Cyclisierungsansatzes mDie PMF-Analyse bestätigt Massen für Fragmente der Srt_{Δ59} mit einer Sequenzübereinstimmung von 39,3 %.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
Srt_{Δ59}-Fragmente					
3052,44	3052,56	-39,7	26,93	[34-61] k.VAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄
3970,57	3969,89	170,7	16,03	[62-96] r.GVSFAEENESLDDQNIAGHTFIDRPNYQFTNLK.a	C ₁₇₄ H ₂₆₁ N ₄₇ O ₆₀
4239,77	424,01	-67,8	0,29	[62-99] r.GVSFAEENESLDDQNIAGHTFIDRPNYQFTNLKAAK.k	C ₁₈₆ H ₂₈₃ N ₅₁ O ₆₃

Tabelle 8.7: PMF-Analyse der Probe 5 des Cyclisierungsansatzes m

Die PMF-Analyse bestätigt Massen der Fragmente für das PhoB^{DBD}-Protein und für Srt_{Δ59}. Die Sequenzübereinstimmung beträgt für Srt_{Δ59} 57,1 %.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
PhoB^{DBD}-Fragmente					
2071,88	2072,02	-68,2	0,08	[52-68] r.EQLLNHVWGTNVYVEDR.t	C ₉₂ H ₁₃₈ N ₂₆ O ₂₉
Srt_{Δ59}-Fragmente					
675,24	675,34	-148,4	0,48	[108-113] k.VGNETR.k	C ₂₆ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₁
719,29	719,37	-109,3	0,58	[153-158] k.TGVWEK.r	C ₃₃ H ₅₀ N ₈ O ₁₀
906,40	906,53	-142,3	0,57	[161-168] k.IFVATEVK.	C ₄₃ H ₇₁ N ₉₀ O ₁₂
1555,60	1555,73	-83,4	0,09	[140-152] k.QLTLITCDDYNEK.t	C ₆₆ H ₁₀₆ N ₁₆ O ₂₅ S
1667,68	1667,84	-96,8	0,09	[47-61] k.EPVYGPATPEQLNR.g	C ₇₄ H ₁₁₄ N ₂₀ O ₂₄
3052,34	3052,56	-72,2	55,08	[34-61] k.VAGYIEIPDADIKEPVYGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄
3969,56	3969,89	-82,9	14,59	[62-96] r.GVSFAEENESLDDQNISIAGHTFIDRPNY QFTNLK.a	C ₁₇₄ H ₂₆₁ N ₄₇ O ₆₀

Tabelle 8.8: PMF-Analyse der Probe 6 des Cyclisierungsansatzes m

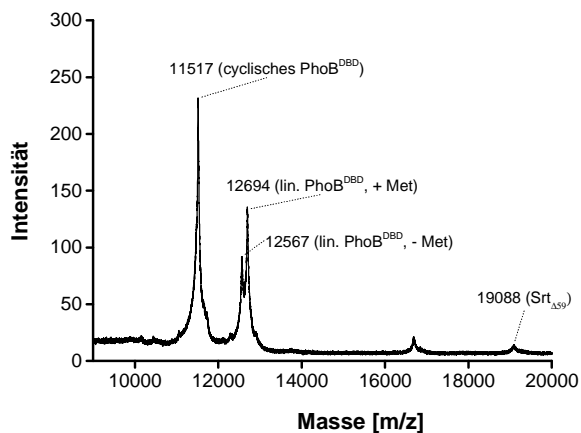
Die PMF-Analyse bestätigt die Massen der Fragmente für das lineare, das cyclische PhoB^{DBD} und für Srt_{Δ59} (Charakt. Fragmente sind in rot markiert). Die Sequenzübereinstimmung beträgt für PhoB^{DBD} 84,5 %.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
PhoB^{DBD}-Fragmente					
951,42	951,46	-46,0	0,78	[80-88] k.ALEPGGHDR.m	C ₃₉ H ₆₂ N ₁₄ O ₁₄
1427,67	1427,73	-37,5	0,41	[37-47] k.LLHFFMTHPER.v	C ₆₇ H ₉₈ N ₁₈ O ₁₅ S
1821,77	1821,83	-34,4	0,80	[95-110] r.GTGYLPSTGF HHHHHH .	C ₈₂ H ₁₀₈ N ₂₈ O ₂₁
2071,93	2072,02	-43,8	69,75	[52-68] r.EQLLNHVWGTNVYVEDR.t	C ₉₂ H ₁₃₈ N ₂₆ O ₂₉
2577,15	2577,28	-52,2	0,37	[48-68] r.VYSREQLLNHVWGTNVYVEDR.t	C ₁₁₅ H ₁₇₃ N ₃₃ O ₃₅
2773,22	2773,35	-44,7	4,90	[95-121] r.GTGYL PSTGGA EVIEMQGLSLDPTSHR.v	C ₁₁₈ H ₁₈₉ N ₃₃ O ₄₂ S
3173,27	3173,53	-80,7	0,15	[21-47] r.VMAGEEPLMGPTTEFKLLHFFMTHPER.v	C ₁₄₄ H ₂₁₇ N ₃₅ O ₄₀ S ₃
3873,61	3873,82	-52,9	1,80	[1-36] .MGGA EVIEMQGLSLDPTSHRVMAGEEPLMGPTTEFK.I	C ₁₆₅ H ₂₆₅ N ₃₅ O ₄₃ S ₄
Srt_{Δ59}-Fragmente					
3052,37	3052,56	-62,6	0,18	[34-61] k.VAGYIEIPDADIKEPVYGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄

Tabelle 8.9: PMF-Analyse der Probe 7 des Cyclisierungsansatzes m

Die PMF-Analyse bestätigt die Massen der Fragmente für das lineare, das cyclische PhoB^{DBD} und für Srt_{Δ59} (Charakt. Fragmente sind in rot markiert). Die Sequenzübereinstimmung beträgt für PhoB^{DBD} 72,7 %.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
PhoB^{DBD}-Fragmente					
951,41	951,46	-53,4	1,25	[80-88] k.ALEPGGHDR.m	C ₃₉ H ₆₂ N ₁₄ O ₁₄
1427,63	1427,73	-65,6	0,49	[37-47] k.LLHFFMTHPER.v	C ₆₇ H ₉₈ N ₁₈ O ₁₅ S
1821,73	1821,83	-54,1	3,46	[95-110] r.GTGYLPSTGF HHHHHH .	C ₈₂ H ₁₀₈ N ₂₈ O ₂₁
2071,90	2072,02	-58,3	44,72	[52-68] r.EQLLNHVWGTNVVVEDR.t	C ₉₂ H ₁₃₈ N ₂₆ O ₂₉
2577,12	2577,28	-63,2	5,45	[48-68] r.VYSREQLLNHVWGTNVVVEDR.t	C ₁₁₅ H ₁₇₃ N ₃₃ O ₃₅
2773,14	2773,35	-73,0	1,20	[95-121] r.GTGY LPSTGG AEVIEMQGLSLDPTSHR.v	C ₁₁₈ H ₁₈₉ N ₃₃ O ₄₂ S
2892,27	2892,48	-69,9	1,82	[52-75] r.EQLLNHVWGTNVVVEDRTVDVHIR.r	C ₁₂₈ H ₁₉₈ N ₃₈ O ₃₉
3173,19	3173,53	-107,1	0,41	[21-47] r.VMAGEEPLMGPTFEKLLHFFMTHPER.v	C ₁₄₄ H ₂₁₇ N ₃₅ O ₄₀ S ₃
Srt_{Δ59}-Fragmente					
3052,34	3052,56	-71,5	1,07	[34-61] k.VAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄

**Cyclisches PhoB^{DBD}-Monomer:**Theoretische Masse: 11518,08 [M+Na]⁺Detektiert: 11517,05 [M+Na]⁺**Cyclisches PhoB^{DBD}-Dimer:**Theoretische Masse: 11518,08 [M+2Na]²⁺22990,18 [M+H]⁺Detektiert: 11517,05 [M+2Na]²⁺**Abbildung 8.7: MALDI-ToF-MS-Spektrum der Cyclisierungsreaktion (m)**

Die Cyclisierungsreaktion **m** führte zu einem deutlichen Peak einer cyclischen PhoB^{DBD}-Spezies (m/z = 11517 [M+Na]⁺). Die weiteren Signale entsprechen dem MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG-Substrat mit und ohne *in vivo* gespaltenem Methionin (m/z = 12694 [M+Na]⁺; m/z = 12567 [M+Na]⁺).

Tabelle 8.10: Übersicht der durchschnittlichen, theoretischen und detektierten Massen der MALDI-ToF-MS-Analyse zur Cyclisierung von MG₂A_Phob^{DBD}-LPSTG (m)

Protein	theor. [m/z]	detekt. [m/z]	
cyclisches PhoB ^{DBD}	11518,08	11517,05	[M+Na] ⁺
G ₂ A_Phob ^{DBD} _LPSTG	12563,15	12566,51	[M+Na] ⁺
MG ₂ A_Phob ^{DBD} _LPSTG	12694,35	12694,22	[M+Na] ⁺
Srt _{Δ59}	19092,31	19087,83	[M+Na] ⁺

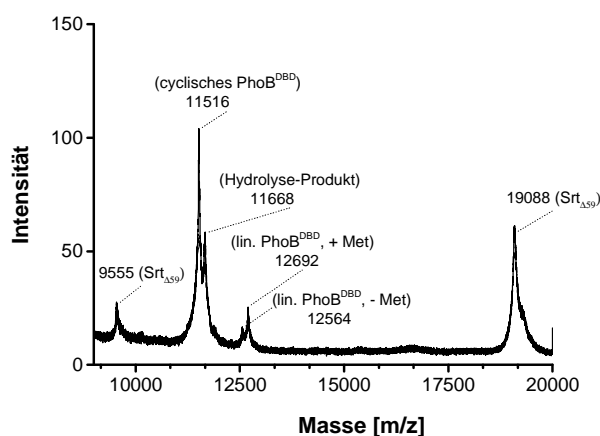


Abbildung 8.8: MALDI-ToF-MS-Spektrum der Cyclisierung von MG₂A_Phob^{DBD}-LPSTG unter verlängerter Inkubationszeit (p)

Das Spektrum zeigt den Cyclisierungsansatz **p** nach 24 h Inkubation. Neben dem Peak des cyclischen Produktes ($m/z = 11516$ [M+Na]⁺) deutet ein Peak bei $m/z = 11668$ [M+Na]⁺ die Bildung des Hydrolyse-Produktes durch die verlängerte Inkubationszeit an. Des Weiteren zeigt das Chromatogramm Signale für das MG₂A_Phob^{DBD}_LPSTG-Substrat mit und ohne *in vivo* gespaltenem Methionin ($m/z = 12692$ [M+Na]⁺; $m/z = 12564$ [M+Na]⁺).

Tabelle 8.11: Übersicht der durchschnittlichen, theoretischen und detektierten Massen der MALDI-ToF-MS-Analyse zur Cyclisierung von MG₂A_Phob^{DBD}-LPSTG (p)

Protein	theor. [m/z]	detekt. [m/z]	
cyclisches PhoB ^{DBD}	11518,08	11515,53	[M+Na] ⁺
Hydrolyse-Produkt	11667,27	11668,44	[M+Na] ⁺
G ₂ A_Phob ^{DBD} _LPSTG	12563,15	12564,12	[M+Na] ⁺
MG ₂ A_Phob ^{DBD} _LPSTG	12694,35	12691,81	[M+Na] ⁺
Srt _{Δ59}	19092,31	19088,41	[M+Na] ⁺
Srt _{Δ59}	9557,65	9555,09	[M+2Na] ²⁺

Tabelle 8.12: Ergebnisse der PMF-Analyse nach tryptischem Verdau von SrtA_{Δ59}_CBD

Die PMF-Analyse bestätigt die Massen von 21 Fragmenten für SrtA_{Δ59}_CBD mit einer Sequenzübereinstimmung von 68,1 % (Charakteristisches Fragment des Enzyms ohne CBD ist in rot markiert).

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
SrtA_{Δ59}_CBD-Fragmente					
607,25	607,32	-119,80	11,75	[97-101] k.MTSIR.d	C ₂₄ H ₄₆ N ₈ O ₈ S
675,29	675,34	-71,30	24,08	[88-93] k.VGNETR.k	C ₂₆ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₁
719,33	719,37	-55,90	61,23	[133-138] k.TGVWEK.r	C ₃₃ H ₅₀ N ₈ O ₁₀
803,42	803,44	-21,70	4,29	[88-94] k.VGNETR.k.y	C ₃₂ H ₅₈ N ₁₂ O ₁₂
831,39	831,41	-23,90	6,78	[81-87] k.GSMVYFK.v	C ₃₉ H ₅₈ N ₈ O ₁₀ S
875,47	875,47	-6,70	11,29	[133-139] k.TGVWEKR.k	C ₃₉ H ₆₂ N ₁₂ O ₁₁
906,53	906,53	3,90	35,34	[141-148] k.IFVATEVK.t	C ₄₃ H ₇₁ N ₉ O ₁₂
959,51	959,50	9,20	8,60	[80-87] k.KGSMVYFK.v	C ₄₅ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₁ S
1034,63	1034,62	10,10	2,68	[140-148] r.KIFVATEVK.t	C ₄₉ H ₈₃ N ₁₁ O ₁₃
1040,61	1040,59	20,40	14,17	[1-9] .MQAKPQIPK.d	C ₄₆ H ₈₁ N ₁₃ O ₁₂ S
1283,74	1283,71	17,60	0,35	[1-11] .MQAKPQIPKDK.s	C ₅₆ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₆ S
1291,78	1291,73	39,60	0,34	[141-152] k. IFVATEVKTGLN .	C ₅₉ H ₉₈ N ₁₄ O ₁₈
1403,79	1403,74	31,00	0,67	[14-26] k.VAGYIEIPDADIK.e	C ₆₄ H ₁₀₂ N ₁₄ O ₂₁
1542,86	1542,80	38,30	9,11	[102-115] r.DVKPTDVGVLDEQK.g	C ₆₆ H ₁₁₁ N ₁₇ O ₂₅
1555,79	1555,73	39,10	2,23	[120-132] k.QLTLITCDDYNEK.t	C ₆₆ H ₁₀₆ N ₁₆ O ₂₅ S
1667,89	1667,84	29,00	2,21	[27-41] k.EPVYGPATPEQLNR.g	C ₇₄ H ₁₁₄ N ₂₀ O ₂₄
1727,97	1727,92	31,90	4,62	[102-117] r.DVKPTDVGVLDEQK.g.k	C ₇₄ H ₁₂₆ N ₂₀ O ₂₇
1798,89	1798,85	23,40	0,24	[118-132] k.DKQLTLITCDDYNEK.t	C ₇₆ H ₁₂₃ N ₁₉ O ₂₉ S
2131,14	2131,11	16,50	0,24	[97-115] k.MTSIRDVKPTDVGVLDEQK.g	C ₉₀ H ₁₅₅ N ₂₅ O ₃₂ S
3052,63	3052,56	23,10	67,45	[14-41] k.VAGYIEIPDADIKEPVYGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄
3969,87	3969,89	-4,20	40,26	[42-76] r.GVSFAEENESLDDQNISIAGHTFIDRPNYQFTNLK.a	C ₁₇₄ H ₂₆₁ N ₄₇ O ₆₀

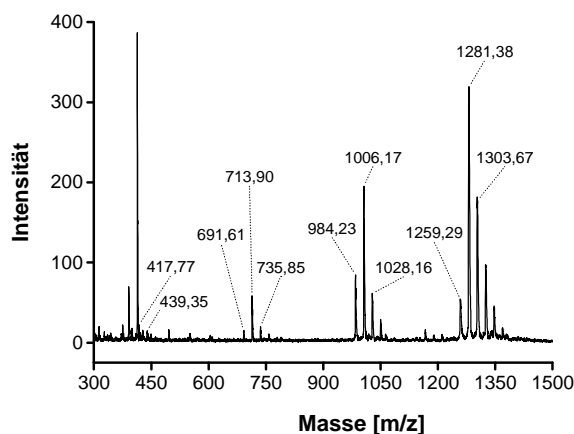


Abbildung 8.9: MALDI-ToF-MS-Spektrum der SML-Testreaktion r mit immobilisierter Sortase A nach 24h Inkubation

Tabelle 8.13: Übersicht der monoisotopischen, theoretischen und detektierten Massen der MALDI-ToF-MS Analyse der SML-Testreaktion r mit immobilisierter Sortase A nach 24 h Inkubation

Edukte	theor.	detekt.		Produkte	theor.	detekt.	
	m/z	m/z			m/z	m/z	
LPETG-Peptid (2)	1260,58	1259,29	$[M+H]^+$	Peptid (3)	985,48	984,23	$[M+H]^+$
	1282,56	1281,38	$[M+Na]^+$		1007,46	1006,17	$[M+Na]^+$
	1298,65	-	$[M+K]^+$		1023,55	-	$[M+K]^+$
	1305,55	1303,67	$[M+2Na-H]^+$		1030,45	1028,16	$[M+2Na-H]^+$
G2HF-Peptid (1)	417,19	417,77	$[M+H]^+$	Peptid (4)	692,29	691,61	$[M+H]^+$
	439,17	439,35	$[M+Na]^+$		714,27	713,9	$[M+Na]^+$
	455,26	-	$[M+K]^+$		730,36	-	$[M+K]^+$
	462,16	-	$[M+2Na-H]^+$		737,26	735,85	$[M+2Na-H]^+$

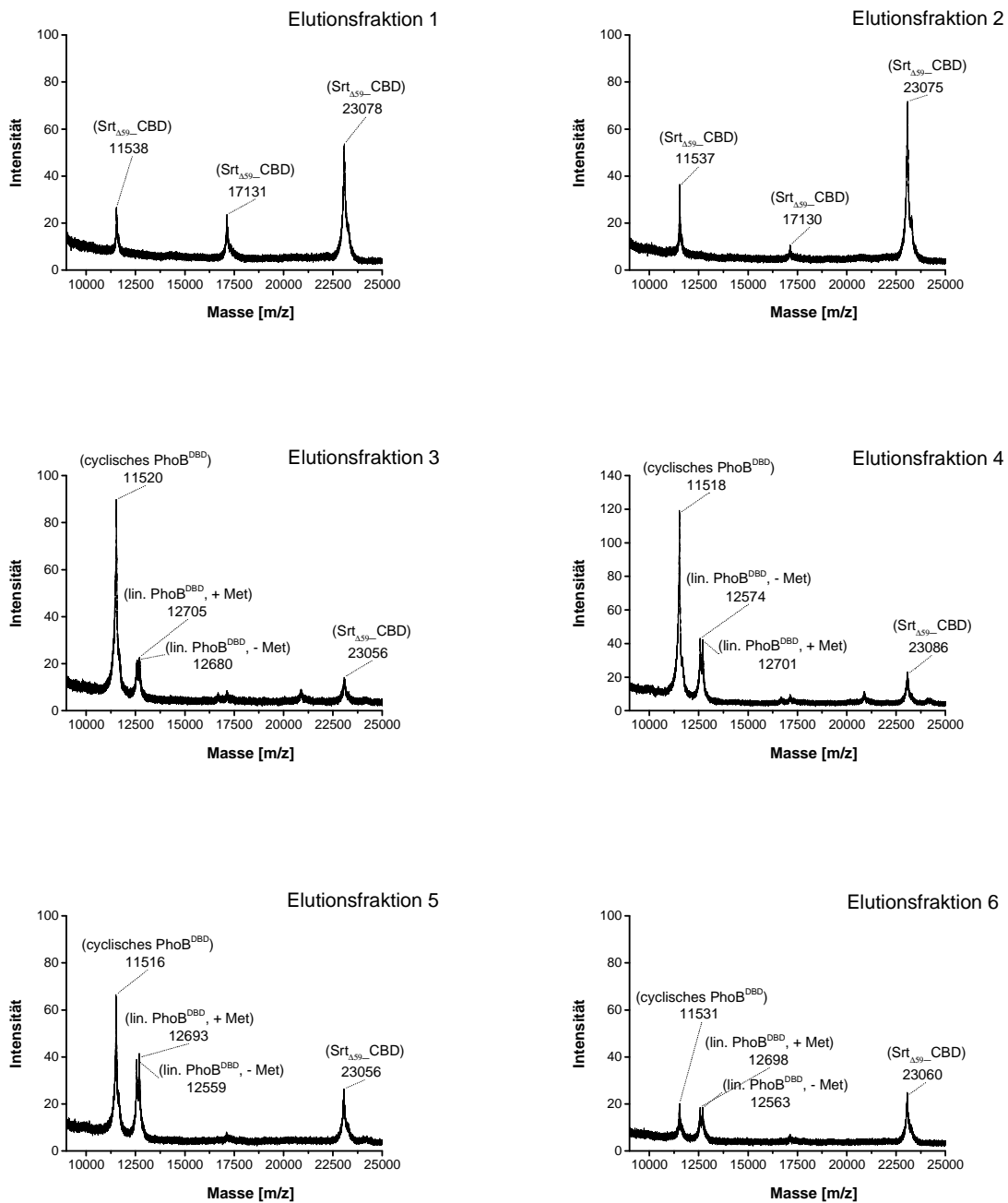


Abbildung 8.10: MALDI-ToF-MS-Spektren der Elutionsfraktionen 1 – 6 der Cyclisierungsreaktion s von PhoB^{DBD} mit immobilisierter Srt_{A59}-CBD

Korrespondierende MALDI-ToF-Spektren zur SDS-PAGE (vgl. Abbildung 5.45)

Tabelle 8.14: PMF-Analyse der Probe 1 des durch Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigten Cyclisierungsansatzes s

Probe der Bande bei ~ 23 kDa. Die Sequenzübereinstimmung beträgt für PhoB^{DBD} 19,5 % und für Srt_{Δ59}_CBD 42,5 %.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
PhoB^{DBD}-Fragmente					
733,31	733,40	-131,10	6,97	[89-94] r.MVQTVR.g	C ₃₀ H ₅₆ N ₁₀ O ₉ S
795,37	795,39	-22,4	6,05	[95-102] r.GTGYLPST.	C ₃₅ H ₅₄ N ₈ O ₁₃
839,38	839,47	-110,1	5,65	[69-75] r.TVDVHIR.r	C ₃₆ H ₆₂ N ₁₂ O ₁₁
Srt_{Δ59}_CBD-Fragmente					
607,22	607,32	-171,6	7,64	[97-101] k.MTSIR.d	C ₂₄ H ₄₆ N ₈ O ₈ S
675,28	675,34	-94,8	17,90	[88-93] k.VGNETR.k	C ₂₆ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₁
719,34	719,37	-45,5	16,72	[133-138] k.TGVWEK.r	C ₃₃ H ₅₀ N ₈ O ₁₀
803,36	803,44	-100,2	6,18	[88-94] k.VGNETR.k.y	C ₃₂ H ₅₈ N ₁₂ O ₁₂
831,38	831,41	-32,5	7,38	[81-87] k.GSMVYFK.v	C ₃₉ H ₅₈ N ₈ O ₁₀ S
875,44	875,47	-37,7	6,46	[133-139] k.TGVWEKR.k	C ₃₉ H ₆₂ N ₁₂ O ₁₁
898,43	898,48	-59,1	6,05	[95-101] k.YKMTSIR.d	C ₃₉ H ₆₇ N ₁₁ O ₁₁ S
906,52	906,53	-13,6	16,26	[141-148] k.IFVATEVK.t	C ₄₃ H ₇₁ N ₉ O ₁₂
959,51	959,50	7,2	9,13	[80-87] k.KGSMVYFK.v	C ₄₅ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₁ S
1040,58	1040,59	-15,8	6,69	[1-9] .MQAKPQIPK.d	C ₄₆ H ₈₁ N ₁₃ O ₁₂ S
1542,98	1542,80	113,5	22,38	[102-115] r.DVKPTDVGVLDEQK.g	C ₆₆ H ₁₁₁ N ₁₇ O ₂₅
1668,15	1667,84	183,8	33,39	[27-41] k.EPVYGPATPEQLNR.g	C ₇₄ H ₁₁₄ N ₂₀ O ₂₄
3052,25	3052,56	-103	11,58	[14-41] k.VAGYIEIPDADIKEPVYGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄

Tabelle 8.15: PMF-Analyse der Probe 2 des durch Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigten Cyclisierungsansatzes s

Probe der Bande bei ~ 25 kDa. Die PMF-Analyse bestätigt die Massen der Fragmente für Srt_{Δ59}-CBD mit einer Sequenzübereinstimmung von 39,1 %.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
Srt_{Δ59}-CBD-Fragmente					
675,40	675,34	85,2	8,54	[88-93] k.VGNETR.k	C ₂₆ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₁
906,50	906,53	-31,5	19,29	[141-148] k.IFVATEVK.t	C ₄₃ H ₇₁ N ₉ O ₁₂
1034,60	1034,62	-19,2	1,97	[140-148] r.KIFVATEVK.t	C ₄₉ H ₈₃ N ₁₁ O ₁₃
1040,58	1040,59	-16	1,54	[1-9] .MQAKPQIPK.d	C ₄₆ H ₈₁ N ₁₃ O ₁₂ S
1403,72	1403,74	-13,2	9,51	[14-26] k.VAGYIEIPDADIK.e	C ₆₄ H ₁₀₂ N ₁₄ O ₂₁
1542,80	1542,80	-0,7	36,65	[102-115] r.DVKPTDVGVLDEQK.g	C ₆₆ H ₁₁₁ N ₁₇ O ₂₅
1555,71	1555,73	-11,7	4,15	[120-132] k.QLTLITCDDYNEK.t	C ₆₆ H ₁₀₆ N ₁₆ O ₂₅ S
1667,83	1667,84	-6,1	29,49	[27-41] k.EPVYGPATPEQLNR.g	C ₇₄ H ₁₁₄ N ₂₀ O ₂₄
1727,89	1727,92	-13,9	2,98	[102-117] r.DVKPTDVGVLDEQK.d	C ₇₄ H ₁₂₆ N ₂₀ O ₂₇
3052,50	3052,56	-21,8	29,61	[14-41] k.VAGYIEIPDADIKEPVYGPATPEQLNR.g	C ₁₃₈ H ₂₁₄ N ₃₄ O ₄₄

Tabelle 8.16: PMF-Analyse der Probe 3 des durch Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigten Cyclisierungsansatzes s

Probe der Bande bei ~ 20 kDa. Die Sequenzübereinstimmung beträgt für PhoB^{DBD} 40,9 % und für Srt_{Δ59}-CBD 20,8 %.

Detektiert [m/z]	Berechnet [m/z]	Δ [ppm]	Rel. Int. [%]	Sequenz	Formel
PhoB^{DBD}-Fragmente					
1665,79	1665,85	-36,2	1,00	[80-94] k.ALEPGGHDRMVQTVR.g	C ₆₉ H ₁₁₆ N ₂₄ O ₂₂ S
1764,82	1764,82	1,6	1,00	[21-36] r.VMAGEEPLMGPTFEK.I	C ₇₇ H ₁₂₁ N ₁₇ O ₂₆ S ₂
2072,11	2072,02	41,7	3,49	[52-68] r.EQLLNHVWGTNVYVEDR.t	C ₁₂₈ H ₁₉₈ N ₃₈ O ₃₉
Srt_{Δ59}-CBD-Fragmente					
1555,74	1555,73	7,8	1,36	[120-132] k.QLTLITCDDYNEK.t	C ₆₆ H ₁₀₆ N ₁₆ O ₂₅ S
1618,80	1618,87	-44,3	1,74	[12-26] k.SKVAGYIEIPDADIK.e	C ₇₃ H ₁₁₉ N ₁₇ O ₂₄
1667,78	1667,84	-32,4	1,06	[27-41] k.EPVYGPATPEQLNR.g	C ₇₄ H ₁₁₄ N ₂₀ O ₂₄

8.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Mechanismen der Protein-DNA-Interaktionen	2
Abbildung 1.2: Zweikomponenten-Regulationssystem PhoR/PhoB	4
Abbildung 1.3: Konsensus-Sequenz des Transkriptionsfaktors PhoB	6
Abbildung 1.4: Kristallstruktur und Aminosäuresequenz der DNA-bindenden Domäne von PhoB	7
Abbildung 1.5: Schematischer Überblick der Wechselwirkungen zwischen einzelnen PhoB ^{DBD} -Aminosäureseitenketten und der Sequenz der <i>pho box</i> -DNA	8
Abbildung 1.6: Kristallstruktur und Aminosäuresequenz der Sortase A aus <i>Staphylococcus aureus</i>	11
Abbildung 1.7: Mechanismus der Transpeptidierung durch Sortase A	13
Abbildung 1.8: Mechanismus der nativen chemischen Ligation (NCL)	15
Abbildung 1.9: Natürlicher Mechanismus des Proteinspleißens	16
Abbildung 1.10: Mechanismus der Ligation exprimierter Proteine (EPL)	17
Abbildung 1.11: C- und N-terminale Modifizierung von Proteinen oder Peptiden durch Sortase A-vermittelte Transpeptidierung	19
Abbildung 1.12: Cyclisierung von Proteinen durch intramolekulare Transpeptidierung mittels SML	23
Abbildung 4.1: Intein-vermittelte Proteinaufreinigung	51
Abbildung 4.2: Temporäre Schutzgruppen der N ^α -Aminofunktion	57
Abbildung 4.3: E1cB-Mechanismus zur Entschützung Fmoc-geschützter Aminosäure mit Piperidin	58
Abbildung 4.4: Aktivierung der Carbonylfunktion einer Aminosäure mit TBTU und DIPEA	59
Abbildung 4.5: Beladung des 2-Chlorotriyl-Harzes mit einer Fmoc-geschützter Aminosäure	60
Abbildung 4.6: Entstehung der Elliptizität bei der CD-Spektroskopie	69
Abbildung 4.7: CD-Spektren isolierter Sekundärstrukturen	70
Abbildung 4.8: Aufbau zur Messung der Oberflächenplasmonresonanz	73
Abbildung 4.9: Vier Phasen des SPR-Sensogramms	74
Abbildung 5.1: Schematischer Überblick der mutierten PhoB ^{DBD} Aminosäureseitenketten und deren Interaktion mit der <i>pho box</i> -DNA	82
Abbildung 5.2: Wachstumskurve der Kultivierung von <i>E. coli</i> zur Expression von PhoB ^{DBD} _WT	84
Abbildung 5.3: Expressionskontrolle der Kultivierung des PhoB ^{DBD} _WT-Proteins mittels SDS-PAGE	85
Abbildung 5.4: Ergebnis der MALDI-ToF-MS Untersuchung des PhoB ^{DBD} _WT-Proteins	86
Abbildung 5.5: CD-Spektren des PhoB ^{DBD} _WT im Vergleich mit den PhoB ^{DBD} Punktmutanten	88
Abbildung 5.6: Untersuchung der DNA-Bindung des PhoB ^{DBD} _WT-Proteins mittels CD-Spektroskopie	91
Abbildung 5.7: Untersuchung der DNA-Bindung von PhoB ^{DBD} _R203A mittels CD-Spektroskopie	92
Abbildung 5.8: Untersuchung der DNA-Bindung von PhoB ^{DBD} _W184A mittels CD-Spektroskopie	93
Abbildung 5.9: Temperaturabhängige CD-Messungen des PhoB ^{DBD} -Wildtyps und der Mutanten	95
Abbildung 5.10: Denaturierung von PhoB ^{DBD} -Proteinen im Verlauf temperaturabhängiger CD-Messungen	95
Abbildung 5.11: DNA-Immobilisierung auf einen SA-Sensorchip	98
Abbildung 5.12: SPR-Sensogramme der Interaktion des PhoB ^{DBD} -Wildtyp Proteins mit der <i>pho box</i> -DNA	99
Abbildung 5.13: SPR-Sensogramme der Interaktion der Mutante PhoB ^{DBD} _R203A mit <i>pho box</i> -DNA	100
Abbildung 5.14: SPR-Sensogramme der Interaktion der Mutante PhoB ^{DBD} _E191A mit <i>pho box</i> -DNA	101
Abbildung 5.15: Sättigungskurven zur Berechnung der K _D -Werte der Interaktionen mit MmMm-DNA	103
Abbildung 5.16: Lokalisation von Glutaminsäure Glu191 im PhoB ^{DBD} -DNA-Komplex	104
Abbildung 5.17: Lokalisation von Glutaminsäure Glu159 im PhoB ^{DBD} -DNA-Komplex	105
Abbildung 5.18: Sättigungskurven zur Berechnung der K _D -Werte der Interaktionen mit MmXx-DNA	109
Abbildung 5.19: Expressionskontrolle des SrtA _{Δ59} -Proteins mittels SDS-PAGE	113

Abbildung 5.20: Sequenzübereinstimmung der SrtA _{Δ59} bei der PMF-Analyse nach tryptischem Verdau	114
Abbildung 5.21: Konzept der SML-Testreaktion	116
Abbildung 5.22: RP-HPLC-Chromatogramme des Reaktionsansatzes a	117
Abbildung 5.23: LC-MS-Analyse des Reaktionsansatzes a	118
Abbildung 5.24: Zeitabhängiger Verlauf der Produktbildung des Reaktionsansatzes d durch SML	119
Abbildung 5.25: Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates (ohne Glycin-Nukleophil)	120
Abbildung 5.26: Untersuchung der Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates während der SML	121
Abbildung 5.27: Variation der molaren Verhältnisse von Enzym und Glycin-Nukleophil (2) der SML	122
Abbildung 5.28: Plasmid-Konstrukte zur Herstellung der MG ₂ A_PhoB ^{DBD} _LPSTG-Mutante	125
Abbildung 5.29: Expressionskontrolle des MG ₂ A_PhoB ^{DBD} _LPSTG-Proteins mittels SDS-PAGE	126
Abbildung 5.30: SDS-PAGE aufgereinigter PhoB ^{DBD} -Proteine	127
Abbildung 5.31: Größenausschluss-Chromatographie des MG ₂ A_PhoB ^{DBD} _LPSTG Proteins	128
Abbildung 5.32: SDS-PAGE der Fraktionen des aufgereinigten MG ₂ A_PhoB ^{DBD} _LPSTG Proteins	128
Abbildung 5.33: Sequenzübereinstimmung von MG ₂ A_PhoB ^{DBD} _LPSTG bei der PMF-Analyse	130
Abbildung 5.34: MALDI-ToF-MS-Analyse des aufgereinigten MG ₂ A_PhoB ^{DBD} -LPSTG-Proteins	130
Abbildung 5.35: Sortase A-vermittelte Cyclisierung des PhoB ^{DBD} -Proteins	131
Abbildung 5.36: MALDI-ToF-MS-Spektrum der Cyclisierungsreaktion von MG ₂ A_PhoB ^{DBD} -LPSTG (j)	132
Abbildung 5.37: SDS-PAGE des Cyclisierungsansatzes j zur Analyse der Sortase A-vermittelten Cyclisierung von PhoB ^{DBD}	133
Abbildung 5.38: SDS-PAGE des Cyclisierungsansatzes m zur Analyse der Sortase A-vermittelten Cyclisierung von PhoB ^{DBD}	135
Abbildung 5.39: SDS-PAGE der Aufreinigung mittels HisTalon-Beads des Cyclisierungsansatzes q	139
Abbildung 5.40: MALDI-ToF-MS-Spektrum des mittels TALON-Beads aufgereinigten Überstands der Cyclisierungsreaktion q	140
Abbildung 5.41: SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression und Immobilisierung von SrtA _{Δ59} _CBD	142
Abbildung 5.42: RP-HPLC-Chromatogramme des Überstands immobilisierter SrtA _{Δ59} _CBD	143
Abbildung 5.43: MALDI-ToF-MS-Spektrum des Überstands immobilisierter SrtA _{Δ59} _CBD	143
Abbildung 5.44: RP-HPLC-Chromatogramme des Reaktionsansatzes r mit immobilisierter SrtA _{Δ59} _CBD	144
Abbildung 5.45: SDS-PAGE der Cyclisierungsreaktion s von PhoB ^{DBD} mit immobilisierter SrtA _{Δ59} _CBD	146
Abbildung 5.46: SDS-PAGE der Größenausschluss-Chromatographie zur Auftrennung des Protein-Gemisches nach Cyclisierungsreaktion s von PhoB ^{DBD} mit immobilisierter SrtA _{Δ59} _CBD	146
Abbildung 8.1: CD-Spektren der Protein-DNA-Bindung verschiedener PhoB ^{DBD} - Mutanten	157
Abbildung 8.2: SPR-Spektren der Protein-DNA Interaktionen verschiedener PhoB ^{DBD} - Mutanten	158
Abbildung 8.3: MALDI-ToF-MS Analyse der aufgereinigten Sortase A (SrtA _{Δ59})	159
Abbildung 8.4: CD-Spektrum der SrtA _{Δ59}	160
Abbildung 8.5: MALDI-ToF-MS-Spektrum der SML-Testreaktion a nach 6h Inkubation	160
Abbildung 8.6: LC-MS-Analyse des Reaktionsansatzes e	161
Abbildung 8.7: MALDI-ToF-MS-Spektrum der Cyclisierungsreaktion (m)	164
Abbildung 8.8: MALDI-ToF-MS-Spektrum der Cyclisierung von MG ₂ A_PhoB ^{DBD} -LPSTG unter verlängerter Inkubationszeit (p)	165
Abbildung 8.9: MALDI-ToF-MS-Spektrum der SML-Testreaktion r mit immobilisierter Sortase A nach 24h Inkubation	167
Abbildung 8.10: MALDI-ToF-MS-Spektren der Elutionsfraktionen 1 – 6 der Cyclisierungsreaktion s von PhoB ^{DBD} mit immobilisierter SrtA _{Δ59} _CBD	168

8.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Beispiele für Gene unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors PhoB ^[11]	5
Tabelle 3.1: Enzyme	30
Tabelle 3.2: Expressionsvektoren	31
Tabelle 3.3: <i>Primer</i> für PhoB ^{DBD} Mutagenese-PCR	32
Tabelle 3.4: <i>Primer</i> für PCR zur Klonierung von PhoB ^{DBD} als bifunktionelles Substrat zur Sortase A Cyclisierung der Sortase A-Erkennungssequenz	32
Tabelle 3.5: DNA-Oligonukleotide	33
Tabelle 3.6: Proteine und Peptide	33
Tabelle 4.1: Pipettierschema für Gradienten-PCR	47
Tabelle 4.2: Reaktionsbedingungen für Gradienten-PCR	47
Tabelle 4.3: Pipettierschema für Mutations-PCR	47
Tabelle 4.4: Reaktionsbedingungen für Mutations-PCR	48
Tabelle 4.5: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	54
Tabelle 4.6: Laufmittelgemische für die RP-HPLC	64
Tabelle 4.7: RP-HPLC-Methoden	64
Tabelle 4.8: Parameter der RP-HPLC mit MS-Kopplung	67
Tabelle 4.9: Konzentrationen und molare Verhältnisse der SML-Testreaktionen	78
Tabelle 4.10: Reaktionsansätze zur Sortase A-vermittelten Cyclisierung von MG ₂ A_PhoB ^{DBD} _LPSTG	79
Tabelle 4.11: Reaktionsansätze zur SML mit immobilisierter SrtA _{Δ59} _CBD	80
Tabelle 5.1: Ergebnisse der MALDI-ToF-MS-Messungen der PhoB ^{DBD} -Punktmutanten	86
Tabelle 5.2: Sequenzen analysierter DNA-Moleküle	87
Tabelle 5.3: Prozentuale Anteile an Sekundärstrukturelemente der PhoB ^{DBD} -Proteine	89
Tabelle 5.4: SPR-Ergebnisse der Interaktionen von PhoB ^{DBD} -Proteinen mit MmMm-DNA	103
Tabelle 5.5: Hill-Koeffizienten der Interaktionen von PhoB ^{DBD} -Proteinen mit der MmMm-DNA	108
Tabelle 5.6: SPR-Ergebnisse der Interaktionen von PhoB ^{DBD} -Proteinen mit MmXx-DNA	109
Tabelle 5.7: Übersicht der theoretischen und detektierten Massen der LC-MS-Analyse der Testreaktion a nach 6 h Inkubation	118
Tabelle 5.8: Ergebnisse der PMF-Analyse nach tryptischem Verdau von MG ₂ A_PhoB ^{DBD} _LPSTG	129
Tabelle 5.9: Ergebnisse der PMF-Analyse nach tryptischem Verdau der Cyclisierungsreaktion j	134
Tabelle 8.1: Ergebnisse der PMF-Analyse nach tryptischem Verdau von SrtA _{Δ59}	159
Tabelle 8.2: Übersicht der monoisotopischen, theoretischen und detektierten Massen der MALDI-ToF-MS Analyse der SML-Testreaktion a nach 6 h Inkubation	160
Tabelle 8.3: PMF-Analyse der Probe 1 des Cyclisierungsansatzes m	161
Tabelle 8.4: PMF-Analyse der Probe 2 des Cyclisierungsansatzes m	162
Tabelle 8.5: PMF-Analyse der Probe 3 des Cyclisierungsansatzes m	162
Tabelle 8.6: PMF-Analyse der Probe 4 des Cyclisierungsansatzes m	162
Tabelle 8.7: PMF-Analyse der Probe 5 des Cyclisierungsansatzes m	163
Tabelle 8.8: PMF-Analyse der Probe 6 des Cyclisierungsansatzes m	163
Tabelle 8.9: PMF-Analyse der Probe 7 des Cyclisierungsansatzes m	164
Tabelle 8.10: Übersicht der durchschnittlichen, theoretischen und detektierten Massen der MALDI-ToF-MS- Analyse zur Cyclisierung von MG ₂ A_PhoB ^{DBD} -LPSTG (m)	165

Tabelle 8.11: Übersicht der durchschnittlichen, theoretischen und detektierten Massen der MALDI-ToF-MS-Analyse zur Cyclisierung von MG ₂ A_Phob ^{DBD} -LPSTG (p)	165
Tabelle 8.12: Ergebnisse der PMF-Analyse nach tryptischem Verdau von SrtA _{Δ59} _CBD	166
Tabelle 8.13: Übersicht der monoisotopischen, theoretischen und detektierten Massen der MALDI-ToF-MS Analyse der SML-Testreaktion r mit immobilisierter Sortase A nach 24 h Inkubation	167
Tabelle 8.14: PMF-Analyse der Probe 1 des durch Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigten Cyclisierungsansatzes s	169
Tabelle 8.15: PMF-Analyse der Probe 2 des durch Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigten Cyclisierungsansatzes s	170
Tabelle 8.16: PMF-Analyse der Probe 3 des durch Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigten Cyclisierungsansatzes s	170

8.5. Abkürzungen

A	Absorption
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BAP	Bakterielle alkalische Phosphatase
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
Boc	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl-Schutzgruppe
bp	Basenpaare
Bzl	Benzyl-Schutzgruppe
CBD	Chitin-Bindedomäne
CD	Circulardichroismus (<i>circular dichroism</i>)
CIP	Alkalische Phosphatase (<i>alkaline calf intestinal phosphatase</i>)
DBD	DNA-Bindedomäne
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylamin
DMF	Dimethylformamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1cB	Mechanismus der β -Eliminierung zur Entschützung von Fmoc
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPL	Ligation exprimierter Proteine (<i>expressed protein ligation</i>)
ESI	Elektrosprayionisation
FC	Flusszelle (<i>flow channel</i>)
Fmoc	9-Fluorenyl-methoxycarbonyl-Schutzgruppe
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	β -Isopropylthio-D-galactopyranosid
IMAC	Metallaffinitätschromatographie (<i>metal ion affinity chromatography</i>)
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M	molar, Mol pro Liter
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MAP	Methionin Aminopeptidase
MESNA	2-Mercaptoethansulfonat-Natrium
min	Minuten

MPW	Millipore Wasser (Reinstwasser)
MS	Massenspektrometrie
NCL	Native chemische Ligation (<i>native chemical ligation</i>)
nm	Nanometer
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidon
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein data base
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RD	Regulatorische Domäne
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanz Einheiten (<i>resonance units</i>)
SDS	Natriumdedecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SML	Sortase vermittelte Protein Ligation (<i>sortase-mediated protein ligation</i>)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>solid phase peptid synthesis</i>)
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
Srt	Sortase
SrtA	Sortase A
SrtB	Sortase B
SrtC	Sortase C
TBTU	O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
tBu	<i>tert.</i> -Butyl-Schutzgruppe
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
ToF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Triphenylmethyl-Schutzgruppe
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>waigth per volume</i>)

8.6. Aminosäuren

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Aminosäuren handelt es sich ausschließlich um L-Aminosäuren.

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

8.7. DNA- und Aminosäuresequenzen

PhoB^{DBD}_WT (126-229), *E. coli*

```
atggcgggtggaagaagtgattgaaatgcagggcctgagcctggatccgaccagccatcgcgtga
tggcggggcgaagaaccgctggaaatgggcccgaaccgaatttaaactgctgcatTTTTTTatgac
ccatccggaacgcgtgtatagccgcgaacagctgctgaaccatgtgtggggcaccaacgtgtat
gtggaagatcgcaccgtggatgtgcatattcgccgcctgcgcaaagcgctggaaccgggcgcc
atgatcgcatgggtgcagaccgtgcgcgccaccggctatcgcttagcaccgcctt
```

```
M A V E E V I E M Q G L S L D P T S H R V M A G E E P L E M G P
T E F K L L H F F M T H P E R V Y S R E Q L L N H V W G T N V Y
V E D R T V D V H I R R L R K A L E P G G H D R M V Q T V R G T
G Y R F S T R F
```

MG₂A_PhoB^{DBD}_LPSTG

```
atggggggggcagaggtgattgagatgcagggattaagtctcgaccgcacatctcaccgagtgatg
gcgggcgaagagccgctggagatggggccgacagaatttaaactgctgcactTTTTTatgacgcat
cctgagcgcgtgtacagccgcgagcagctgttaaaccacgtctggggaactaacgtgtatgtggaa
gaccgcacggctgatgtccacattcgctgcctgcgtaaagcactggagcccggcgggcatgaccgc
atggtgcagaccgtgcgcggtacaggatatcttccttcaaccggctttcatcatcatcatcat
taa
```

```
M G G A E V I E M Q G L S L D P T S H R V M A G E E P L E M G P
T E F K L L H F F M T H P E R V Y S R E Q L L N H V W G T N V Y
V E D R T V D V H I R R L R K A L E P G G H D R M V Q T V R G T
G Y L P S T G F H H H H H H
```

Sortase A (Srt_{Δ59}, 60-206), *Staphylococcus aureus*

```
atgCGCGGCAGCCATCATCATCATCATCATGGCAGCAAACCGCATATTGATAACTATCTGCATG
ATAAAGATGAAAAAATTGAACAGTATGATAAAAACGTGAAAGAACAGGCGAGCAAAGATAAAAA
ACAGCAGGCAGAAACCGCAGATCCGAAAGATAAAAAGCAAAGTGGCGGGCTATATTGAAATCCG
GATGCGGATATTAAGAACCAGGTGTATCCGGGCCCCGGCGACCCCGGAACAGCTGAACCGCGGC
TGAGCTTTGCGGAAGAAAACCGCAGCCTGGATGATCAGAACATTAGCATTGCGGGCCATACCTT
TATTGATCGCCCGAACTATCAGTTTACCAACCTGAAAGCGGCAGAAAAAAGGCAGCATGGTGTAT
TTAAAGTGGGCAACGAAACCCGCAAATATAAAATGACCAGCATTGCGGATGTGAAACCGACCG
ATGTGGGCGTGTGGATGAACAGAAAGGCAAAGATCAGCTGACCCTGATTACCTGCGATGATTA
TAACGAAAAAACCGCGTGTGGGAAAAACGAAAATTTTTGTGGCGACCGAAGTGAAA
```

```
M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M Q A K P Q I P K D K S
K V A G Y I E I P D A D I K E P V Y P G P A T P E Q L N R G V S
F A E E N E S L D D Q N I S I A G H T F I D R P N Y Q F T N L K
A A K K G S M V Y F K V G N E T R K Y K M T S I R D V K P T D V
G V L D E Q K G K D K Q L T L I T C D D Y N E K T G V W E K R K
I F V A T E V K
```

Sortase A (Srt_{Δ59}-CBD, 60-206), *Staphylococcus aureus*, mit Chitin-Bindedomäne

atgcaagctaaacctcaaattccgaaagataaatcgaaagtggcaggctatattgaaattccag
atgctgatattaaagaaccagtatatccaggaccagcaacacctgaacaattaaatagagggtg
aagctttgcagaagaaaatgaatcactagatgatcaaaaatatttcaattgcaggacacactttc
attgaccgtccgaactatcaatttacaatcttaaagcagccaaaaaaggtagtatgggtgtact
ttaaagttggtaatgaaacacgtaagtataaaatgacaagtataagagatgttaagcctacaga
tgtaggagttctagatgaacaaaaaggtaaagataaacaattaaacttaattacttgtgatgat
tacaatgaaaagacagggcgtttgggaaaaacgtaaaatctttgtagctacagaagtcaaaaccg
gtctgaactcaggcctcacgacaaatcctgggtgatccgcttggcagggtcaacacagcttatac
tgcgggacaattgggtcacatataacggcaagacgtataaatgtttgcagccccacacctccttg
gcaggatgggaaccatccaacgttcctgccttgtggcagcttcaatga

M Q A K P Q I P K D K S K V A G Y I E I P D A D I K E P V Y P G
P A T P E Q L N R G V S F A E E N E S L D D Q N I S I A G H T F
I D R P N Y Q F T N L K A A K K G S M V Y F K V G N E T R K Y K
M T S I R D V K P T D V G V L D E Q K G K D K Q L T L I T C D D
Y N E K T G V W E K R K I F V A T E V K T G L N S G L T T N P G
V S A W Q V N T A Y T A G Q L V T Y N G K T Y K C L Q P H T S L
A G W E P S N V P A L W Q L Q

8.8. Veröffentlichungen

- M. Ritzefeld, K. Wollschläger, G. Niemann, D. Anselmetti, N. Sewald, Minor groove recognition is important for the transcription factor PhoB: a surface plasmon resonance study. *Mol. BioSyst.*, **2011**, 7, 3132-3142.

Poster-Präsentationen:

- G. Niemann, M. Ritzefeld, K. Wollschläger & N. Sewald, Interaction of DNA and DNA-binding proteins by the example of the transcription factor PhoB from *E. coli*.
31st European Peptide Symposium, Copenhagen, Denmark, 05. – 09.09.2010
- G. Niemann, M. Ritzefeld, K. Wollschläger & N. Sewald, DNA-protein interactions between the transcription factor PhoB from *E. coli* and corresponding DNA sequences.
10st German Peptide Symposium, Berlin, 07. – 10.03.2011
- G. Niemann, M. Ritzefeld, K. Wollschläger & N. Sewald, The transcription factor PhoB: DNA-protein interactions.
SFB613 Meeting, Loccum, 27. – 28.09.2011
- G. Niemann, M. Ritzefeld & N. Sewald, DNA-protein interactions: Binding of the PhoB protein to corresponding DNA sequences.
SFB613 Workshop, Bielefeld, 28.09.2012

Vorträge:

- G. Niemann, M. Ritzefeld & N. Sewald, DNA-protein interactions between transcriptionfactor PhoB from *E. coli* and corresponding DNA sequences.
1st Retreat of the International Graduate School of Chemistry and Biochemistry
Bielefeld University, Extertal, 07. – 09.04.2010

8.9. Literaturverzeichnis

- [1] Rohs, R., Jin, X., West, S. M., Joshi, R., Honig, B., Mann, R. S., "Origins of Specificity in Protein-DNA Recognition", *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 233–269.
- [2] Seeman, N. C., Rosenberg, J. M., Rich, A., "Sequence specific recognition of double helical nucleic acids by proteins", *Proc Natl Acad Sci U S A* **1976**, 804–808.
- [3] Yamane, T., Okamura, H., Ikeguchi, M., Nishimura, Y., Kidera, A., "Water-mediated interactions between DNA and PhoB DNA-binding/transactivation domain: NMR-restrained molecular dynamics in explicit water environment", *Proteins* **2008**, *71*, 1970–1983.
- [4] Luscombe, N. M., Laskowski, R. A., Thornton, J. M., "Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level", *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, 2860–2874.
- [5] Rohs, R., West, S. M., Sosinsky, A., Liu, P., Mann, R. S., Honig, B., "The role of DNA shape in protein-DNA recognition", *Nature* **2009**, *461*, 1248–1253.
- [6] Luscombe, N. M., Austin, S. E., Berman, H. M., Thornton, J. M., "An overview of the structures of protein-DNA complexes", *Genome Biology* **2000**, *1*, 1–37.
- [7] Gajiwala, K. S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B. P., Reith, W., Mach, B., Burley, S. K., "Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding", *Nature* **2000**, *403*, 916–921.
- [8] Papworth, M., Kolasinska, P., Minczuk, M., "Designer zinc-finger proteins and their applications", *Gene* **2006**, *366*, 27–38.
- [9] Landschulz, W. H., Johnson, P. F., McKnight, S. L., "The Leucine Zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins", *Science* **1988**, *240*, 1759–1764.
- [10] T. Mizuno, "Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*", *DNA Research* **1997**, *4*, 161–168.
- [11] Wanner B. L., "Gene regulation by phosphate in enteric bacteria", *Journal of Cellular Biochemistry* **1993**, *51*, 47–54.
- [12] VanBogelen, R. A., Olson, E. R., Wanner, B. L., Neidhardt, F. C., "Global Analysis of Proteins Synthesized during Phosphorus Restriction in *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology* **1996**, *178*, 4344–4366.
- [13] Yang, C., Huang, T.-W., Wen, S.-Y., Chang, C.-Y., Tsai, S.-F., Wu, W.-F., Chang, C.-H., "Genome-wide PhoB binding and gene expression profiles reveal the hierarchical gene regulatory network of phosphate starvation in *Escherichia coli*", *PLoS One* **2012**, *7*, e47314.
- [14] Hsieh, Y.-J., Wanner, B. L., "Global regulation by the seven-component Pi signaling system", *Current Opinion in Microbiology* **2010**, *13*, 198–203.
- [15] Baek, J. H., Lee, S. Y., "Transcriptome Analysis of Phosphate Starvation Response in *Escherichia coli*", *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2007**, *17*, 244–252.
- [16] Baek, J. H., Lee, S. Y., "Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*", *J Mol Biol* **2006**, 104–109.
- [17] Suziedeliene, E., Suziedelis, K., Garbenciute, V., Normark, S., "The Acid-Inducible *asr* Gene in *Escherichia coli*: Transcriptional Control by the *phoBR* Operon", *Journal of Bacteriology* **1999**, *181*, 2084–2093.

- [18] Lamarche, M. G., Wanner, B. L., Crepin, S., Harel, J., S. Crépin, J. Harel, "The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis", *FEMS Microbiology Reviews* **2008**, 32, 461–473.
- [19] Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Nakata, A., "Nucleotide Sequence of the *phoB* Gene, the Positive Regulatory Gene for the Phosphate Regulon of *Escherichia coli* K-12", *J Mol Biol* **1986**, 190, 37–44.
- [20] Blanco, A. G., Sola, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M., "Tandem DNA Recognition by PhoB, a Two-Component Signal Transduction Transcriptional Activator", *Structure* **2002**, 10, 701–713.
- [21] Bachhawat, P., Swapna, G.V.T., Montelione, G. T., A. M. Stock, "Mechanism of Activation for Transcription Factor PhoB Suggested by Different Modes of Dimerization in the Inactive and Active States", *Structure* **2005**, 13, 1353–1363.
- [22] Ritzeveld, M., Wollschläger, K., Niemann, G., Anselmetti, D., Sewald, N., "Minor groove recognition is important for the transcription factor PhoB: a surface plasmon resonance study", *Mol. BioSyst.* **2011**, 7, 3132.
- [23] Makino, K., Amemura, M., Kawamoto, T., Kimura, S., Shinagawa, H., Nakata, A., Suzuki, M., "DNA Binding of PhoB and its Interaction with RNA Polymerase", *J Mol Biol* **1996**, 259, 15–26.
- [24] Blanco, A. G., Canals, A., Bernués, J., Solà, M., Coll, M., "The structure of a transcription activation subcomplex reveals how $\sigma 70$ is recruited to PhoB promoters", *EMBO J* **2011**, 30, 3776–3785.
- [25] W. R. McCleary, "The activation of PhoB by acetylphosphate", *Mol Microbiol* **1996**, 20, 1155–1163.
- [26] Arribas-Bosacoma, R., Kim, S-K., Ferrer-Orta, C., Blanco, A. G., Pereira, P. J. B., Gomis-Rüth, F. X., Wanner, B. L., Coll, M., Solà, M., "The X-ray Crystal Structures of Two Constitutively Active Mutants of the *Escherichia coli* PhoB Receiver Domain Give Insights into Activation", *Journal of Molecular Biology* **2007**, 366, 626–641.
- [27] Ellison, D. W., McCleary, W. R., "The Unphosphorylated Receiver Domain of PhoB Silences the Activity of Its Output Domain", *Journal of Bacteriology* **2000**, 182, 6592–6597.
- [28] Solà, M., Gomis-Rüth, F. X., Serrano, L., Gonzales, A., Coll, M., "Three-dimensional Crystal Structure of the Transcription Factor PhoB Receiver Domain", *J Mol Biol* **1999**, 285, 675–687.
- [29] Kumar, A., Grimes, B., Fujita, N., Makino, K., Malloch, R. A., Hayward, R. S., Ishihama, A., "Role of the Sigma70 Subunit of *Escherichia coli* RNA Polymerase in Transcription Activation", *Journal of Molecular Biology* **1994**, 235, 405–413.
- [30] Stephenson, K., Hoch, J. A., "Developing Inhibitors to Selectively Target Two-Component and Phosphorelay Signal Transduction Systems of Pathogenic Microorganisms", *Current Medicinal Chemistry* **2004**, 11, 765–773.
- [31] Barrett, J. F., Hoch, J. A., "Two-Component Signal Transduction as a Target for Microbial Anti-Infective Therapy", *Antimicrob. Agents Chemother* **1998**, 42, 1529–1536.
- [32] Popp, M. W.-L., Ploegh, H. L., "Making and Breaking Peptide Bonds: Protein Engineering Using Sortase", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 5024–5032.
- [33] Maresso, A. W., Schneewind, O., "Sortase as a Target of Anti-Infective Therapy", *Pharmacological Reviews* **2008**, 60, 128–141.
- [34] a) Pallen, M. J., Lam, A. C., Antonio, M., Dunbar, K., "An embarrassment of sortases - a richness of substrates?", *TRENDS in Microbiology* **2001**, 9, 97–101; b) Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Bierne, H., "Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria" **2005**, *Research in Microbiology*, 289–297; c) Comfort, D., Clubb, R. T., "A Comparative Genome Analysis Identifies Distinct Sorting Pathways in Gram-Positive Bacteria", *Infection and Immunity* **2004**, 72, 2710–2722;

- [35] Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H., Schneewind, O., "Staphylococcus aureus Sortase, an Enzyme that Anchors Surface Proteins to the Cell Wall", *Science* **1999**, *285*, 760–763.
- [36] Schneewind, O., Model, P., Fischetti, V.A., "Sorting of protein A to the Staphylococcal cell wall" **1992**, *70*, 267–281.
- [37] Fischetti, V.A., Pancholi, V., Schneewind, O., "Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci", *Mol Microbiol* **1990**, *4*, 1603–1605.
- [38] Mazmanian, S. K., Skaar, E. P., Gaspar, A. H Humayun, M., Gorniki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D. M., Schneewind, O., "Passage of Heme-Iron Across the Envelope of Staphylococcus aureus", *Science* **2003**, *299*, 906–909.
- [39] Ton-That, H., Schneewind, O., "Assembly of pili in Gram-positive bacteria", *TRENDS in Microbiology* **2004**, *12*, 228–234.
- [40] Kruger, R. G., Otvos, B., Frankel, B. A., Bentley, M., Dostal, P., McCafferty, D. G., "Analysis of the Substrate Specificity of the Staphylococcus aureus Sortase Transpeptidase SrtA", *Biochemistry* **2004**, *43*, 1541–1551.
- [41] Roche, F. M., Massey, R., Peacock, S. J., Day, N. P. J., Visai, L., Speziale, P., Lam, A., Pallen, M., Foster, T. J., "Characterization of novel LPXTG-containing proteins of Staphylococcus aureus identified from genome sequences", *Microbiology* **2003**, *149*, 643–654.
- [42] Huang, X., Aulabaugh, A., Ding, W., Kapoor, B., Alksne, L., Tabei, K., Ellestad, G., "Kinetic Mechanism of Staphylococcus aureus Sortase SrtA", *Biochemistry* **2003**, *42*, 11307–11315.
- [43] Zong, Y., Bice, T. W., Ton-That, H., Schneewind, O., Narajana, S. V. L., "Crystal Structures of Staphylococcus aureus Sortase A and Its Substrate Complex", *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 31383–31389.
- [44] Ton-That, H., Mazmanian, S. K., Alksne, L., Schneewind, O., "Anchoring of Surface Proteins to the Cell Wall of Staphylococcus aureus. CYSTEINE 184 AND HISTIDINE 120 OF SORTASE FORM A THIOLATE-IMIDAZOLIUM ION PAIR FOR CATALYSIS", *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 7447–7452.
- [45] Suree, N., Liew, C. K., Villareal, V. A., Thieu, W., Fadeev, E. A., Clemens, J. J., Jung, M. E., Clubb, R. T., "The Structure of the Staphylococcus aureus Sortase-Substrate Complex Reveals How the Universally Conserved LPXTG Sorting Signal Is Recognized", *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 24465–24477.
- [46] Zhang, R., Wu, R., Joachimiak, G., Mazmanian, S. K., Missiakas, D. M., Gornicki, P., Schneewind, O., Joachimiak, A., "Structures of Sortase B from *Staphylococcus aureus* and *Bacillus anthracis* reveal catalytic amino acid triad in the active site", *Structure* **2004**, *12*, 1147–1156.
- [47] Neiers, F., Madhurantakam, C., Falker, S., Manzano, C., Dessen, A., Normark, S., Henriques-Normark, B., Achour, A., "Two Crystal Structures of Pneumococcal Pilus Sortase C Provide Novel Insights into Catalysis and Substrate Specificity", *Journal of Molecular Biology* **2009**, *393*, 704–716.
- [48] Bentley, M. L., Lamb, E. C., McCafferty, D. G., "Mutagenesis Studies of Substrate Recognition and Catalysis in the Sortase A Transpeptidase from Staphylococcus aureus", *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 14762–14771.
- [49] Ilangovan, U., Ton-That, H., Iwahara, J., Schneewind, O., Clubb, R. T., "Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*", *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *6056*–6061.
- [50] Naik, M. T., Suree, N., Ilangovan, U., Liew, C. K., Thieu, W., Campbell, D. O., Clemens, J. J., Jung, M. E., Clubb, R. T., "Staphylococcus aureus Sortase A Transpeptidase: CALCIUM PROMOTES

- SORTING SIGNAL BINDING BY ALTERING THE MOBILITY AND STRUCTURE OF AN ACTIVE SITE LOOP", *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *281*, 1817–1826.
- [51] Hirakawa, H., Ishikawa, S., Nagamune, T., "Design of Ca²⁺-independent Staphylococcus aureus sortase A mutants", *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 2955–2961.
- [52] Race, P. R., Bentley, M. L., Melvin, J. A., Crow, A., Hughes, R. K., Smith, W. D., Sessions, R. B., Kehoe, M. A., McCafferty, D. G., Banfield, M. J., "Crystal Structure of Streptococcus pyogenes Sortase A: IMPLICATIONS FOR SORTASE MECHANISM", *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *284*, 6924–6933.
- [53] Mazmanian, S. K., Ton-That, H., Su, K., Schneewind, O., "An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during Staphylococcus aureus pathogenesis", *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 2293–2298.
- [54] Frankel, B. A., Tong, Y., Bentley, M. L., Fitzgerald, M. C., McCafferty, D. G., "Mutational Analysis of Active Site Residues in the Staphylococcus aureus Transpeptidase SrtA", *Biochemistry* **2007**, *46*, 7269–7278.
- [55] Frankel, B. A., Kruger, R. G., Robinson, D. E., Kelleher, N. L., McCafferty, D. G., "Staphylococcus aureus Sortase Transpeptidase SrtA: Insight into the Kinetic Mechanism and Evidence for a Reverse Protonation Catalytic Mechanism", *Biochemistry* **2005**, *44*, 11188–11200.
- [56] Perry, A. M., Ton-That, H., Mazmanian, S. K., Schneewind, O., "Anchoring of Surface Proteins to the Cell Wall of Staphylococcus aureus. III. LIPID II IS AN IN VIVO PEPTIDOGLYCAN SUBSTRATE FOR SORTASE-CATALYZED SURFACE PROTEIN ANCHORING", *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 16241–16248.
- [57] P. C. Appelbaum, "The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant Staphylococcus aureus", *Clinical Microbiology and Infection* **2006**, *12*, Suppl. 1, 16–23.
- [58] a) Mazmanian, S. K., Liu, G., Jensen, E. R., Lenoy, E., Schneewind, O., "Staphylococcus aureus sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections", *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 5510–5515; b) Bolken, T. C., Franke, C. A., Jones, K. F., Zeller, G. O., Jones, C. H., Dutton, E. K., Hruby, D. E., "Inactivation of the srtA Gene in Streptococcus gordonii Inhibits Cell Wall Anchoring of Surface Proteins and Decreases In Vitro and In Vivo Adhesion", *Infection and Immunity* **2001**, *69*, 75–80; c) Bierne, H., Mazmanian, S. K., Trost, M., Pucciarelli, M. G., Liu, G., Dehoux, P., Jansch, L., Garcia-del Portillo, F., Schneewind, O., Cossart, P., "Inactivation of the srtA gene in Listeria monocytogenes inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence", *Molecular Microbiology* **2002**, *43*, 869–881;
- [59] Frankel, B. A., Bentley, M., Kruger, R. G., McCafferty, D. G., "Vinyl Sulfones: Inhibitors of SrtA, a Transpeptidase Required for Cell Wall Protein Anchoring and Virulence in Staphylococcus aureus", *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3404–3405.
- [60] Park, B.-S., Kim, J.-G., Kim, M.-R., Lee, S.-E., Takeoka, G. R., Oh, K.-B., Kim, J.-H., "Curcuma longa L. Constituents Inhibit Sortase A and Staphylococcus aureus Cell Adhesion to Fibronectin", *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9005–9009.
- [61] Maresso, A. W., Wu, R., Kern, J. W., Zhang, R., Janik, D., Missiakas, D. M., Duban, M.-E., Joachimiak, A., Schneewind, O., "Activation of Inhibitors by Sortase Triggers Irreversible Modification of the Active Site", *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 23129–23139.
- [62] Hackenberger, C. P. R., Schwarzer, D., "Chemoselektive Ligations- und Modifikationsstrategien für Peptide und Proteine", *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182–10228.
- [63] Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., "Synthesis of proteins by native chemical ligation", *Science* **1994**, *226*, 776–779.

- [64] Kang, J., Macmillan, D., "Peptide and protein thioester synthesis via N→S acyl transfer", *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1993.
- [65] Merrifield R. B., "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide", *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [66] Xu, M-Q., Evans, T. C., "Intein-Mediated Ligation and Cyclization of Expressed Proteins", *Methods* **2001**, *24*, 257–277.
- [67] Muir, T. W., Songhi, D., Cole, P. A., "Expressed protein ligation; a general method for protein engineering", *Proceedings of the National Academy of Science* **1998**, *95*, 6705–6710.
- [68] Perler, F. B., Davis, E. O., Dean, G. E., Gimble, F. S., Jack, W. E., Neff, N., Noren, C. J., Thorner, J., Belfort, M., "Protein splicing elements: inteins and exteins - a definition of terms and recommended nomenclature", *Nucleic Acids Research* **1994**, *22*, 1125–1127.
- [69] Elleuche, S., Pöggeler, S., "Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology", *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, *87*, 479–489.
- [70] Chong, S., Mersha, F. B., Comb, D. G., Scott, M. E., Landry, D., Vence, L. M., Perler, F. B., Benner, J., Kucera, R. B., Hirvonen, C. A., Pelletier, J. J., Paulus, H., Xu, M-Q., "Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable anity tag derived from a protein splicing element", *Gene* **1997**, *192*, 271–281.
- [71] T. W. Muir, "Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation", *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249–289.
- [72] Tsukiji, S., Nagamune, T., "Sortase-Mediated Ligation: A Gift from Gram-Positive Bacteria to Protein Engineering", *ChemBioChem* **2009**, *10*, 787–798.
- [73] Mao, H., Hart, S. A., Schink, A., Pollok, B. A., "Sortase-Mediated Protein Ligation: A New Method for Protein Engineering", *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2670–2671.
- [74] Nelson, J. W., Chamessian, A. G., McEnaney, P. J., Murelli, R. P., Kazmiercak, B. I., Spiegel, D. A., "A Biosynthetic Strategy for Re-engineering the Staphylococcus aureus Cell Wall with Non-native Small Molecules", *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 1147–1155.
- [75] Chan, L., Cross, H. F., She, J. K., Cavalli, G., Martins, H. F. P., Neylon, C., Koutsopoulos, S., "Covalent Attachment of Proteins to Solid Supports and Surfaces via Sortase-Mediated Ligation", *PLoS ONE* **2007**, *2*, e1164.
- [76] Clow, F., Fraser, J. D., Proft, T., "Immobilization of proteins to biacore sensor chips using Staphylococcus aureus sortase A", *Biotechnol Lett* **2008**, *30*, 1603–1607.
- [77] Samantaray, S., Marathe, U., Dasgupta, S., Nandicoori, V K., Roy, R. P., "Peptide–Sugar Ligation Catalyzed by Transpeptidase Sortase: A Facile Approach to Neoglycoconjugate Synthesis", *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2132–2133.
- [78] Pritz, S., Wolf, Y., Kraetke, O., Klose, J., Bienert, M., Beyermann, M., "Synthesis of Biologically Active Peptide Nucleic Acid–Peptide Conjugates by Sortase-Mediated Ligation", *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3909–3912.
- [79] Parthasarathy, R., Subramanian, S., Boder, Eric T., "Sortase A as a Novel Molecular “Stapler” for Sequence-Specific Protein Conjugation", *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 469–476.
- [80] Tanaka, T., Yamamoto, T., Tsukiji, S., Nagamune, T., "Site-Specific Protein Modification on Living Cells Catalyzed by Sortase", *ChemBioChem* **2008**, *9*, 802–807.
- [81] Pritz, S., Kraetke, O., Klose, A., Klose, J., Rothmund, S., Fechner, K., Bienert, M., Beyermann, M., "Synthese von Proteinmimetika mit nichtlinearer Rückgratstruktur durch Kombination von molekularbiologischen, enzymatischen und chemischen Methoden", *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3698–3701.

- [82] Antos, J. M., Miller, G. M., Grotenbreg, G. M., Ploegh, H. L., "Lipid Modification of Proteins through Sortase-Catalyzed Transpeptidation", *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16338–16343.
- [83] Steinhagen, M., Zunker, K., Nordsieck, K., Beck-Sickinger, A. G., "Large scale modification of biomolecules using immobilized sortase A from *Staphylococcus aureus*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 3504–3510.
- [84] Williamson, D. J., Fascione, M. A., Webb, M. E., Turnbull, W. B., "Efficient N-Terminal Labeling of Proteins by Use of Sortase", *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9511–9514.
- [85] Kang, S.-H., Cho, M.-J., Kole, R., "Up-Regulation of Luciferase Gene Expression with Antisense Oligonucleotides: Implications and Applications in Functional Assay Development †", *Biochemistry* **1998**, *37*, 6235–6239.
- [86] Budzik, J. M., Marraffini, L. A., Soudat, P., Whitelegge, J. P., Faull, K. F., Schneewind, O., "Cell wall anchor structure of BcpA pili in *Bacillus anthracis*", *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 36676–36686.
- [87] Conlan, B. F., Gillon, A. D., Craik, D. J., Anderson, M. A., "Circular proteins and mechanisms of cyclization", *Peptid Science* **2010**, *94*, 573–583.
- [88] M. Trabi, D. J. Craik, "Circular proteins-no end in sight", *TRENDS in Biochemical Sciences* **2002**, *27*, 132–138.
- [89] Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Galves, G., Samyn, B., Van Beeumen, J., "Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48", *Journal of Bacteriology* **1994**, *176*, 6334–6339.
- [90] Huai, Q., Kim, H.-Y., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragon, A., Liu, J. O., Ke, H., "Crystal structure of calcineurin–cyclophilin– cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin–drug complexes", *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 12037–12042.
- [91] a) Gruber, C. W., Elliot, A. G., Ireland, D. C., Delprete, P. G., Dessein, S., Goransson, U., Trabi, M., Wang, C. K., Kinghorn, A. B., Robbrecht, E., Craik, D. J., "Distribution and Evolution of Circular Miniproteins in Flowering Plants", *The Plant Cell* **2008**, *20*, 2471–2483; b) Craik, D.J. et al, "Plant Cyclotides: A Unique Family of Cyclic and Knotted Proteins that Defines the Cyclic Cystine Knot Structural Motif", *Journal of Molecular Biology* **1999**, *294*, 1327–1336;
- [92] Gran, L., Sangberg, F., Sletten, K., "Oldenlandia affinis (R&S) DC A plant containing uteroactive peptides used in African traditional medicine", *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, *70*, 197–203.
- [93] a) Craik, D. J., Cemazar, M., Daly, N. L., "The cyclotides and related macrocyclic peptides as scaffolds in drug design", *Current Opinion in Drug Discovery Development* **2006**, *9*, 251–260; b) Jagadish, K., Camarero, J. A., "Cyclotides, a promising molecular scaffold for peptide-based therapeutics", *Biopolymers* **2010**, *94*, 611–616;
- [94] Tang, Y., Ösapray, G., Ösapray, K., Tran, D., Miller, C. J., Quellerie, A. J., Selsted, M. E., "A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of Two Truncated - Defensins", *Science* **1999**, *286*, 498–502.
- [95] N. Venkataraman, A. L. Cole, P. Ruchala, A. J. Waring, R. I. Lehrer, O. Stuchlik, J. Pohl, A. M. Cole, M. Emerman, "Reawakening Retrocyclins: Ancestral Human Defensins Active Against HIV-1", *Plos Biol* **2009**, *7*, e95.
- [96] L. Cascales, D. J. Craik, "Naturally occurring circular proteins: distribution, biosynthesis and evolution", *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5035.
- [97] Antos, J. M., Popp, M. W.-L., Ernst, R., Chew, G.-L., Spooner, E., Ploegh, H. L., "A Straight Path to Circular Proteins", *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 16028–16036.

- [98] Bolscher, J. G. M., Oudhoff, M. J., Nazmi, K., Antos, J. M., Guimaraes, C. P., Spooner, E., Haney, E. F., Garcia Vallejo, J. J., Vogel, H. J., van't Hof, W., Ploegh, H. L., Veerman, E. C. I., "Sortase A as a tool for high-yield histatin cyclization", *The FASEB Journal* **2011**, *25*, 2650–2658.
- [99] K. Wollschläger, "Klonierung, Isolierung und funktionelle Studien des Proteins PhoB aus *E. coli*", *Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie* **2005**.
- [100] Kushner S. A., "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI derived plasmids", *In genetic Engineering* **1978**, 17–23.
- [101] QIAGEN, *Qiaprep MiniPrep Handbook*, **2012**.
- [102] Sambrook, J., Russell, D. W., "Agarose Gel Electrophoresis", *Cold Spring Harbor Protocols* **2006**.
- [103] QIAGEN, *Qiaquick Spin Handbook*, **2012**.
- [104] Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Science* **1977**, *74*, 5463–5467.
- [105] NEB, *manual IMPACT-TWIN E6950*, **2006**.
- [106] Laemmli U. K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.", *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [107] a) Yu, H. M., Chen, S. T., Wang, K. T., "Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation", *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4781–4784; b) Collins, J. M., Leadbeater, N. E., "Microwave energy: a versatile tool for the biosciences", *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1141–1150;
- [108] Bacsa, B., Desai, B., Dibo, G., Kappe, C. O., "Rapid solid-phase peptide synthesis using thermal and controlled microwave irradiation", *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 633–638.
- [109] Sewald, N., Jakubke, H.-D., *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, **2002**.
- [110] White, P., Keyte, J. W., Bailey, K., Bloomberg, G., "Expediting the Fmoc solid phase synthesis of long peptides through the application of dimethylloxazolidine dipeptides", *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 18–26.
- [111] Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D., Stavropoulos, G., "2-Chlorotrityl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage", *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 513–520.
- [112] C. Bartz, "Immobilisierung des Enzyms Sortase A aus *Staphylococcus aureus* und funktionelle Studien", *Bachelorarbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie* **2012**.
- [113] Niedermeyer, Timo H. J., M. Strohm, J. M. Koomen, "mMass as a Software Tool for the Annotation of Cyclic Peptide Tandem Mass Spectra", *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44913.
- [114] Koenig, T., Menze, B. H., Kirchner, M., Monigatti, F., Parker, K. C., Patterson, T., Steen, J. J., Hamprecht, F. A., Steen, H., "Robust Prediction of the MASCOT Score for an Improved Quality Assessment in Mass Spectrometric Proteomics", *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3708–3717.
- [115] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, **2008**.
- [116] Kelly, S. M., Jess, T. J., Price, N. C., "How to study proteins by circular dichroism", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2005**, *1751*, 119–139.
- [117] Ranjbar, B., Gill, P., "Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review", *Chemical Biology & Drug Design* **2009**, *74*, 101–120.
- [118] Ivanov, V. I. & Minyat, E. E., "The transitions between right and left handed form of poly (G) DNA", *Nucleic Acids Research* **1981**, *9*, 4783–4798.
- [119] Greenfield, N. J., Fasman, G. D., "Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation", *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108–4116.
- [120] Chen, Y.-H., Yang, Y.-T., Martinez, H. M., "Determination of the secondary structure of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion", *Biochemistry* **1972**, *11*, 4120–4131.

- [121] Pelton, J. T., McLean, L. R., "Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure", *Analytical Biochemistry* **2000**, *277*, 167–176.
- [122] N. J. Greenfield, "Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions", *Nat Protoc* **2007**, *1*, 2527–2535.
- [123] Ivanov, V. I., Minchenkova, L. E., Schyolkina, A. K., Poeltayev, A. I., "Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism", *Biopolymers* **1973**, *12*, 89–110.
- [124] GE Healthcare (Biacore), *Technology Note 1, Surface plasmon resonance*, **2009**.
- [125] Zeng, S., Yong, K-T., Roy, I., Dinh, X-Q., Yu, X., Luan, F., "A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications", *Plasmonics* **2011**, *6*, 491–506.
- [126] Liedberg, B., Nylander, C., Lundström, I., "Biosensing with surface plasmon resonance - how all started", *Biosensors & Bioelectronics* **1995**, *10*, i–ix.
- [127] Majka, J., Speck, C. in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Ed.: H. Seitz), Springer Berlin Heidelberg, **2006**.
- [128] D. G. Myszka, "Improving biosensor analysis", *Journal of Molecular Recognition* **1999**, *12*, 279–284.
- [129] Nominé, Y., Botuyan, M. V., Bajzer, Z., Owen, W. G., Caride, A. J., Wasielewski, E., Mer, G., "Kinetic Analysis of Interaction of BRCA1 Tandem Breast Cancer C-Terminal Domains with Phosphorylated Peptides Reveals Two Binding Conformations †", *Biochemistry* **2008**, *47*, 9866–9879.
- [130] A. V. Hill, "The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves", *Journal of Physiology* **1910**, (Supplement) IV–VII.
- [131] Morton, T. A., Myszka, D. G., Chaiken, I. M., "Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: A comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration", *Analytical Biochemistry* **1995**, *227*, 176–185.
- [132] Bass, S. H., Mulkerrin, M. G., Wells, J. A., "A systematic mutational analysis of hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor", *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88*, 4498–4502.
- [133] Wollschläger, K., Gaus, K., Körnig, A., Eckel, R., Wilking, S.-D., McIntosh, M., Majer, Z., Becker, A., Ros, R., Anselmetti, D., Sewald, N., "Single-Molecule Experiments to Elucidate the Minimal Requirement for DNA Recognition by Transcription Factor Epitopes", *Small* **2009**, *5*, 484–495.
- [134] Ritzeveld, M., Sewald, N., "Real-Time Analysis of Specific Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance", *Journal of Amino Acids* **2012**, *2012*, 1–19.
- [135] K. Wollschläger, "Modulation der Bindung des Transkriptionsfaktors PhoB aus *Escherichia coli* an DNA", *Dissertation, Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie* **2009**.
- [136] M. Ritzeveld, V. Walhorn, C. Kleineberg, A. Bieker, K. Kock, C. Herrmann, D. Anselmetti, N. Sewald, "Cooperative Binding of PhoB DBD to Its Cognate DNA Sequence—A Combined Application of Single-Molecule and Ensemble Methods", *Biochemistry* **2013**, 131107103251004.
- [137] K. Rippe, "Analysis of protein-DNA binding at equilibrium", *B. I. F. Futura* **1997**, *12*, 20–26.
- [138] Ton-That, H., Liu, G., Mazmanian, S. K., Faull, K. F., Schneewind, O., "Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif", *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 12424–12429.
- [139] Lu, C., Zhu, J., Wang, Y., Umeda, A., Cowmeadow, R. B., Lai, E., Moreno, G. N., Person, M. D., Zhang, Z., "Staphylococcus aureus Sortase A Exists as a Dimeric Protein In Vitro", *Biochemistry* **2007**, *46*, 9346–9354.

- [140] Geoghegan, K. F., Dixon, H. B. F., Rosner, P. J., Hoth, L. R., Lanzetti, A. J., Borzilleri, K. A., Marr, E. S., Pezzullo, L. H., Martin, L. B., LeMotte, P. K., McColl, A. S., Kamath, A. V., Stroh, J. G., "Spontaneous -N-6-Phosphogluconoylation of a "His Tag" in Escherichia coli: The Cause of Extra Mass of 258 or 178 Da in Fusion Proteins", *Analytical Biochemistry* **1999**, *267*, 169–184.
- [141] Liao, Y.-D. Jeng, J.-C., Wang, C.-F., Wang, S.-C., Chang, S.-T., "Removal of N-terminal methionine from recombinant proteins by engineered E. coli methionine aminopeptidase", *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1802–1810.
- [142] Frottin, F., Martinez, A., Peynot, P., Mitra, S., Holz, R. C., Giglione, C., Meinel, T., "The Proteomics of N-terminal Methionine Cleavage", *Molecular and Cellular Proteomics* **2006**, 2336–3249.
- [143] Wu, Z., Guo, X., Guo, Z., "Sortase A-catalyzed peptide cyclization for the synthesis of macrocyclic peptides and glycopeptides", *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9218.