

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Zielgerichtete Mutagenese nach QuikChange

Für Untersuchungen von Protein-Lipid- bzw. Protein-Protein-Interaktionen wurde das “QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit” (Agilent, Waldbronn, Deutschland) verwendet, um zielgerichtet Punktmutanten zu präparieren. Ziel war es, durch Punktmutationen Cysteine an den Aminosäure-Positionen 120 und 126 von Wildtyp (wt)-BamB einzufügen, um diese später mit IAF oder IAEDANS zu markieren und für FRET-Experimente verwenden zu können.

Nach Handbuch des Herstellers ergaben sich die Parameter für die PCR-Ansätze für die Mutagenese von wt-BamB (pET22b-BamB+ss+his) mit den konstruierten Primern:

G120C-BamB-forward:	5' gtgtgaccgtgtctgtgttccatgtctacattggcag	3'
G120C-BamB-reverse:	5' ctgccaatgtagacatggcaaccagacacggtcacac	3'
S126C-BamB-forward:	5' catgtctacattggctgcgaaaaggcgcagg	3'
S126C-BamB-reverse:	5' cctgcgccttttcgcagccaatgtagacatg	3'

Die Primer wurden mit Hilfe des QuikChange Primer Designs konstruiert und von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

#### 2.1.2 Transformation der mutierten DNA in den *E. coli*-Stamm BL21-DE3

Bei Nachweis der korrekten Mutation via Sequenzierung wurde die mutierte DNA in den *E. coli* Stamm BL21-DE3 transformiert, der eine Neomycin (Neo)-Resistenz besitzt. Das Plasmid pet22b (Novagen (Merck), Darmstadt, Deutschland) in das die DNA-Sequenz von BamB kloniert wurde, besitzt eine Ampicillin (Amp)-Resistenz. 100 µl der kompetenten BL21-DE3-Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut, ca. 5 ng DNA hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock fand bei 42 °C für 2 min statt und der Ansatz wurde für 5 min auf Eis gekühlt. 950 µl LB-Medium wurden zugefügt und der Ansatz bei 37 °C für 1 h unter schütteln (300 rpm) inkubiert. Auf LB-Agarplatten, mit entsprechenden Antibiotika, wurden 100 µl des Ansatzes ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

### 2.2 Reinigung von BamB aus *E. coli*

#### 2.2.1 Expression und Extraktion

Die Entwicklung einer Methode zur Reinigung von BamB war Inhalt der Bachelorarbeit von Sonja Hartinger (2014). Das Verfahren ist in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Zunächst wurden 50 ml LB-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton/Pepton, 1 % NaCl) autoklaviert (120 °C, 20 min), nach Abkühlen mit Amp (100 µg/ml) versetzt, anschließend mit dem *E. coli*-Stamm PC2889-pET22b-Yfgl+ss+his (Glycerol-Stock) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Im Verhältnis 1:40 wurden 2 x 1 L LB<sub>Amp</sub>-Medien mit der Übernacht-Kultur angeimpft und unter den vorigen Bedingungen weiter inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 erreicht wurde. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur für ca. 4 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Jeweils vor und nach Induktion mit IPTG wurden Proben zur weiteren Analyse auf einem SDS-Gel gesichert. Nachfolgend wurde die Kultur für 20 min bei 4 °C und 6000 rpm in einer Sorvall Lynx 600 Zentrifuge (Thermoscientific, Waltham, USA) zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml Tris-Puffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet konnte bei -20 °C aufbewahrt werden.

Um die Zellen aufzubrechen (zu lysieren), wurde das Pellet in 50 ml Lysepuffer (20 mM Tris, 0,1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME), pH 8), versetzt mit DNase (Sigma, 1 µg/ml), RNase (Serva, 1 µg/ml), MgCl<sub>2</sub> (5 mM) und einer Protease-Inhibitor-Tablette (Roche, Rotkreuz, Schweiz), resuspendiert. Lysozym (Sigma, 25 µg/ml) wurde hinzugefügt und die Zellsuspension in einem Eisbad für 30 min rührend inkubiert. Die Zellen wurden per Ultraschall mit der Makrospitze eines Ultraschallgenerators (Branson WD 450, Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) für 50 min mit einer Amplitude von 15 % behandelt und das Zell-Lysat anschließend für 10 min bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert (Sorvall Lynx 600), um unlösliche Zellreste zu entfernen. Der Überstand, der die löslichen Komponenten und die Membranfraktionen enthält, wurde in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) bei 36000 rpm und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Die ribosomalen Fragmente und löslichen Proteine wurden mit dem Überstand verworfen, das Pellet in Lysepuffer mit einem Homogenisierer gelöst und erneut bei 36000 rpm, 4 °C und 1 h zentrifugiert. In Äquilibriumspuffer (20 mM Tris, 8 M Urea, 1 mM EDTA, 0,1 %  $\beta$ -ME, 5 mM Imidazol, pH 8) wurde das Pellet gelöst und bei 3000 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert, um ungelöste Zellaggregate zu entfernen. Die Fraktion wurde bei -20 °C aufbewahrt und anschließend zur weiteren Proteinreinigung (siehe Abschnitt 2.2.2) verwendet.

### 2.2.2 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie wird das gewünschte Protein mit einer spezifischen Markierung (*tag*) an eine Affinitätssäule, in diesem Fall mit einem His-*tag* an das Affinitätsmaterial Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose, gebunden. Die Elution erfolgte durch einen Imidazol-Gradienten (5-500 mM) bei einem Gesamtvolumen von 200 ml. Zur Reinigung des Proteins wurde eine FPLC-Anlage (ÄKTaprime plus, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland) verwendet. Zunächst wurde die Säule mit Äquilibrierungspuffer gewaschen, um das umgebende Milieu dem Protein anzu-

passen. Nach Beladung der Säule mit der Fraktion aus Abschnitt 2.2.1 wurden die ungebundenen Proteine durch Spülen mit Waschpuffer entfernt und die Elutionsproben in 5 ml Fraktionen in Reagenzgläsern aufgefangen. Per UV-Absorption bei 280 nm wurde ermittelt in welchen Fraktionen sich Protein befindet. Der Durchfluss, der Waschschritt und die Elutionsfraktionen wurden auf einem 12 %-igem SDS-Gel analysiert.

### 2.2.3 Entfernung von Imidazol mit Hilfe von Dialysemembranen

Nach der Analyse der Banden auf dem SDS-Gel wurden die Proben, die ähnliche Bandenmuster ergaben, jeweils zu Sammlungen zusammengefügt (*pool*). Die Dialyseschläuche (Membranen mit einem MWCO von 6000-8000 Da, SpectraPor, Los Angeles, USA) wurden für 10 min in ddH<sub>2</sub>O gekocht, um die schützende Glycerin-Schicht zu entfernen. Sie wurden nach Zugabe der Probe in 500 ml Tris-Puffer (20 mM Tris, 7 M Urea, 1 mM EDTA, 0,05 %  $\beta$ -ME, pH 8) überführt. Die Probe wurde bei 4 °C aufbewahrt und der Puffer dreimal erneuert.

### 2.2.4 Konzentration des Proteins

Um die Proteinkonzentration in der Lösung zu steigern, wurde nach der Dialyse (Abschnitt 2.2.3) eine Ultrafiltration durchgeführt sofern das Volumen der Lösung > 4 ml betrug. Bei kleinerem Volumen der Lösung wurden sogenannte Zentrifugenkonzentratoren eingesetzt. Diese sind wie Eppendorfgeläße aufgebaut, enthalten jedoch einen Zylinder mit Membranfilter (MWCO: 5000 Da, sartorius stedim BIOTECH, Göttingen, Deutschland), der Wasser durchlässt, Moleküle mit einer Masse, die größer als der MWCO ist, aber zurückhält. Die Konzentratoren wurden zunächst mit ddH<sub>2</sub>O und dann mit Tris-Puffer zentrifugiert, um das Milieu für das Protein anzugleichen. Die Proben aus den Dialysemembranen wurden in die Tubes überführt und bei 8000 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Proteine können dabei den Filter nicht passieren, wodurch die Proteinkonzentration, durch die Abnahme des Volumens der Flüssigkeit, erhöht wird. Der Durchfluss wurde jeweils in ein Falcongefäß (FG) überführt und gesichert. Dieser wurde anschließend, gemeinsam mit dem aufkonzentrierten Anteil, auf einem 12 %-igem SDS-Gel aufgetragen und analysiert. Die Proteinkonzentration von BamB wurde im Anschluss nach Lowry bestimmt (Lowry *et al.* 1951).

## 2.3 Kinetische Analysen zur Faltung von OmpA

### 2.3.1 Herstellung von unilamellaren Vesikeln

Zur Überprüfung der Faltungskinetik von OmpA in Abhängigkeit von BamA, BamB oder BamD, dem Anteil der Sekundärstrukturelemente von BamB mittels CD-Spektroskopie oder der Analyse der Protein-Lipid-Interaktionen wurden unilamellare

Vesikel aus Phospholipiden verschiedener Kettenlängen verwendet. Aufgrund der gewählten Vesikel-Präparationsmethode lassen sich Vesikel unterschiedlicher Größe herstellen. Man unterscheidet z. B. kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUVs) mit einem Durchmesser von 25-35 nm und große unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles*, LUVs) mit einem Durchmesser von 100 nm.

In der vorliegenden Arbeit wurden SUVs aus den 18 C-kettigen Lipiden 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), -phosphoethanolamin (DOPE) und -phosphoglycerol (DOPG) hergestellt, während LUVs aus Phospholipiden mit Fettsäureketten einer Länge von 12 C-Atomen, nämlich 1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DLPC), -phospho-ethanolamin (DLPE) und -phosphoryl-glycerol (DLPG) präpariert wurden. Sowohl SUVs als auch LUVs wurden in verschiedenen Lipid-Zusammensetzungen präpariert.

Zur Herstellung von SUVs wurden die Phospholipide zunächst in Puderform (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) abgewogen, in einem Chloroform-Methanol-Mix (Verhältnis 5:1) gelöst und drehend unter Stickstoffbegasung getrocknet, so dass Lipidfilme am Glasrand entstanden. Ferner wurden die Ansätze unter Vakuum in einem Exsikkator für 4 h getrocknet und anschließend zur Aufbewahrung mit Argon begast und bei -20 °C aufbewahrt. Die Lipidfilme wurden bei Verwendung in Glycinpuffer (10 mM Glycin, 2 mM EDTA, pH 8) hydratisiert, in einen Spitzkolben überführt und für 50 min mit der Mikrospritze des Ultraschallgerätes bei 10 % Amplitude und einem Pulszyklus von 50 % in einem Eisbad beschallt, um SUVs mit einem Durchmesser von 25-35 nm zu erhalten. Der Titan-Staub wurde durch Zentrifugation für 1 min bei 1000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5424 R, Hamburg, Deutschland) entfernt und der Lipidansatz über Nacht bei 4 °C equilibriert.

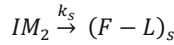
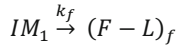
Für die Präparation von LUVs wurde ein Miniextruder (Avanti Polar Lipids) verwendet. Um die bei der Hydratisierung der Lipide entstehenden multilamellaren Vesikel aufzubrechen und zu zerkleinern, wurden die gelösten Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren (30 s) und wieder aufgetaut (5 min, 35 °C, insgesamt sieben Durchläufe). Die Membran des Miniextruders wurde etwas mit Puffer angefeuchtet und die Probe wurde 30 Mal durch die Poren der Polycarbonat-Membran durchgedrückt (15 *passes-through*). Es wurden Membranen mit Poren von 100 nm Durchmesser verwendet.

### 2.3.2 KTSE-Assay

Die native und die ungefaltete Form von OmpA wandern in einem SDS-Polyacrylamid-Gel unterschiedlich schnell, sofern man die Proben nicht hitzenaturiert. Dies führt zu scheinbar unterschiedlichen molekularen Massen im Vergleich zu den Standard-Markern. Liegt OmpA komplett gefaltet vor, so führt dies zu einer Migration entsprechend einer scheinbaren molekularen Masse von ca. 30 kDa, während ungefaltetes OmpA eine Migration entsprechend einer Molmasse von ca. 35 kDa aufweist (Schweizer *et al.* 1978.). Im Gegensatz zur stabil-gefalteten Form

von OmpA, werden Faltungsintermediate des OmpA durch SDS denaturiert. Sie lassen sich daher im Gel normalerweise nicht nachweisen und migrieren als entfaltetes OmpA.

Faltungskinetiken können mit Hilfe eines Modells gut analysiert werden, das auf der Beobachtung basiert, dass der Faltungsprozess von OmpA in zwei Phasen verläuft. Diese entstehen durch zwei Varianten von wässrigen Faltungsintermediaten,  $IM_1$  und  $IM_2$ , die in Lösung koexistieren, was mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen gezeigt wurde (Qu *et al.* 2007). Diese Intermediate des OmpA falten unterschiedlich schnell, d.h. mit einer schnellen und einer langsamen Geschwindigkeitskonstante ( $k_f$  und  $k_s$ ):



Die kinetische Analyse der Faltungsreaktionen führt zu Gleichung 2.1, die den Stoffmengenanteil der gefalteten Form als Funktion der Zeit beschreibt:

$$X_{FP}(t) = 1 - [A_f \exp(-k_f t) + (1 - A_f) \exp(-k_s t)] \quad (2.1)$$

Dabei repräsentiert  $X_{FP}$  den Stoffmengenanteil des gefalteten OmpA zum Zeitpunkt  $t$  und  $A_f$  entspricht dem Anteil des schnellen Faltungsprozesses am letzten Faltungsschritt des OmpA. Wenn  $k_s$  gegen Null strebt ( $k_s \rightarrow 0$ ), so existiert nur die schnelle Phase, so dass die Faltungskinetik durch die Gleichung 2.2 beschrieben werden kann.

$$X_{FP}(t) = A_f [1 - \exp(-k_f t)] \quad (2.2)$$

In diesem Fall würde  $A_f$  der zu erwartenden Ausbeute an gefalteten OmpA für  $t \rightarrow \infty$  entsprechen (Patel *et al.* 2009).

In den hier durchgeführten kinetischen Experimenten betrug das Ansatzvolumen 200  $\mu$ l, bestehend aus 5  $\mu$ M OmpA, harnstofffreiem Glycinpuffer und den SUVs oder LUVs im 200-fachen Überschuss zu OmpA, so dass die Harnstoffkonzentration unter 0,5 M lag. Wurde die Rückfaltung in Abhängigkeit von BamA, BamB oder BamD analysiert, wurden 10  $\mu$ M des jeweiligen Proteins dem Ansatz hinzugefügt und mit harnstofffreiem Glycinpuffer auf 200  $\mu$ l aufgefüllt. BamA, BamB oder BamD wurden jeweils für 30 min bei RT vorinkubiert, damit die Proteine sich an die Membran anlagern konnten. Das Faltungsexperiment wurde durch die Zugabe von OmpA initiiert. Die OmpA-Proben wurden anschließend bei verschiedenen Temperaturen

(10 °C bis 45 °C) und 450 rpm inkubiert und zu festgelegten Zeitpunkten (4, 8, 16, 30, 60, 120, 180 und 240 min) wurden Proben entnommen. Nachfolgend wurden 16 µl Probe in 4 µl vorgelegten 5x SDS-Probenpuffer (10 % SDS, 50 % Glycerin, 10 % β-ME, 0,1 % Bromphenolblau, pH 6,8) überführt und auf einem 12 %- bzw. 15 %-igem SDS-Gel analysiert.

Der prozentuale Anteil an gefaltetem und ungefaltetem OmpA, gemessen an der Protein-färbung durch *Coomassie brilliant blue*, wurde mit ImageJ 1.46r ausgewertet und mit Igor Pro 6.34 graphisch dargestellt (Kleinschmidt 2003).

### 2.3.3 Sekundärstrukturanalysen mit CD-Spektroskopie

Für die Messung wurde 12-15 µM dialysiertes BamB (5 mM HEPES-Puffer, pH 7) verwendet. Weitere Analysen erfolgten mit den entsprechenden Lipiden im 200-fachen Überschuss bzw. LDAO im 1000-fachen Überschuss zu BamB. Das Ansatzvolumen betrug 120 µl und für die Messung wurden 0,5 mm Quarzküvetten (Hellma QS, Müllheim, Deutschland) verwendet. Die CD-Spektren wurden in einem Bereich von 180-260 nm, einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min, einer Bandbreite von 1 nm und einer Integrationszeit von 1 s bei RT erfasst (JASCO J-815 CD-Spektrometer). Als Hintergrund diente HEPES-Puffer, der gegebenenfalls mit dem entsprechenden molaren Überschuss an Lipid versetzt wurde. Das Hintergrundspektrum wurde von der finalen Messung subtrahiert. Pro Ansatz wurden 6 Messungen gemittelt. Das vermessene Spektrum wurde im Weiteren normalisiert, um die mittlere molare Elliptizität pro Rest,  $[\theta](\lambda)$ , in der Einheit Grad cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup> nach Gleichung 2.3 zu erhalten

$$[\theta](\lambda) = 100 \cdot \theta(\lambda) / (l \cdot c \cdot n) \quad (2.3)$$

$\theta(\lambda)$  stellt die gemessene Elliptizität als Funktion der Wellenlänge  $\lambda$  dar.  $l$  ist als die Länge der Küvette in cm definiert, während  $c$  die Konzentration in mol/l und  $n$  die Anzahl der Aminosäuren des Proteins angibt.

Die normalisierten CD-Spektren wurden mit dem frei verfügbaren Onlineserver DichroWeb (Lobley *et al.*, 2002, Whitmore *et al.* 2004) ausgewertet. Mittels verschiedener Referenzdaten (Datenset 4 und 7) und Algorithmen kann die Sekundärstruktur des Proteins ermittelt werden, indem die CD-Spektren des unbekannten Proteins mit einer Datenbank von Proteinen bekannter Konformationen verglichen werden. Verwendet wurden die Analyseprogramme SELCON3 (Sreerema und Woody 1993), CDSSTR (Compton und Johnson 1986) und CONTIN (Provencher und Glöckner 1981).

### 2.3.4 Lipid/Protein-Interaktionsanalysen mittels Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Fluoreszenzintensität von BamB wird in Abhängigkeit verschiedener molarer Mengen und Zusammensetzungen von Lipiden detektiert, um die Lipid/Protein-

Stöchiometrie in Lösung zu ermitteln. Bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 330 \text{ nm}$  kann der Anteil von gebundenem und freien, ungebundenem BamB an der Gesamtfluoreszenz,  $F_{330 \text{ nm}}$ , nach Gleichung 2.4 beschrieben werden.

$$F_{330 \text{ nm}} = f_b[P_B] + f_f[P_F] \quad (2.4)$$

wobei  $P_B$  und  $P_F$  die jeweiligen Konzentrationen des gebundenen und des freien Proteins sind, die sich zur gesamten Proteinkonzentration  $P_T$  addieren.  $f_b$  bzw.  $f_f$  beschreiben die Fluoreszenzkoeffizienten der gebundenen bzw. der freien beiden Form des Proteins.

Die Anzahl der Bindungsstellen  $n$  kann mit der Gleichung 2.5 bestimmt werden, die sich aus dem Massenwirkungsgesetz für die Bindungsreaktion des Proteins an Lipidmembranen herleiten lässt.

$$[P_B] = \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{K_a} + L_T + n[P_T] - \left[ \left( \frac{1}{K_a} + [L_T] + n[P_T] \right)^2 - 4n[P_T] \right]^{\frac{1}{2}} \right\} \quad (2.5)$$

Mit einbezogen sind dabei die Lipidkonzentration  $L_T$  und die Assoziationskonstante  $K_a$ . Anschließend kann die gemessene Intensität der Fluoreszenzemission ( $F_{330 \text{ nm}}$ ) als Funktion des Lipid/Protein-Verhältnisses geplottet werden (Qu *et al.* 2007).

Für die Messungen wurden zunächst jeweils  $0,33 \text{ }\mu\text{M}$  BamB mit verschiedenen molaren Überschüssen an Lipid in einem Gesamtvolumen von  $1 \text{ ml}$  Glycinpuffer angesetzt. Diese Proben wurden in  $10 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$  Quarzküvetten (Hellma QS, Müllheim, Deutschland) überführt und die Fluoreszenzspektren der Proben mit einem Spex Fluorolog-3 Spektralfluorimeter mit Einzel-Photonenzählung (Horiba Scientific, München, Deutschland) und Doppelmonochromatoren in Anregungs- und Emissionsstrahlengang gemessen. Die Tryptophan-Reste von BamB wurden dazu bei einer Wellenlänge von  $295 \text{ nm}$  angeregt und die Trp-Fluoreszenzspektren in einem Wellenlängenbereich von  $310$  bis  $400 \text{ nm}$  in  $0,5 \text{ nm}$  Intervallen mit einer Integrationszeit von  $0,05 \text{ s}$  ermittelt. Zunächst wurde das Hintergrundspektrum ohne BamB aus drei gemittelten Spektren erfasst und im Weiteren von der finalen Messung nach Zugabe von BamB (sechs gemittelte Messungen) subtrahiert.

Einbau und Faltung von  $\beta$ -Fass Membranproteinen in  
Bakterien

Funktion von BamB beim Einbau des  
Außenmembranproteins A (OmpA) aus *Escherichia coli*  
Gerlach, L.

2016, XVIII, 79 S. 26 Abb. in Farbe., Softcover

ISBN: 978-3-658-12653-7