

Abb. 1.1 Struktur verschiedener Phospholipide. Das Grundgerüst von Phosphoglyceriden besteht aus zwei Fettsäuren, gebunden an Glycerin, das wiederum mit einem Phosphatrest verknüpft ist (*links*). Die polare Kopfgruppe, gebunden an die Phosphatgruppe, typifiziert das Lipid. Phosphatidylethanolamine (PE) kommen am häufigsten in bakteriellen Zellmembranen vor (*mitte*), während Phosphatidylcholin (PC, *rechts*) in den meisten Eukaryoten, allerdings selten in Bakterien auftritt (Cooper 2000).¹

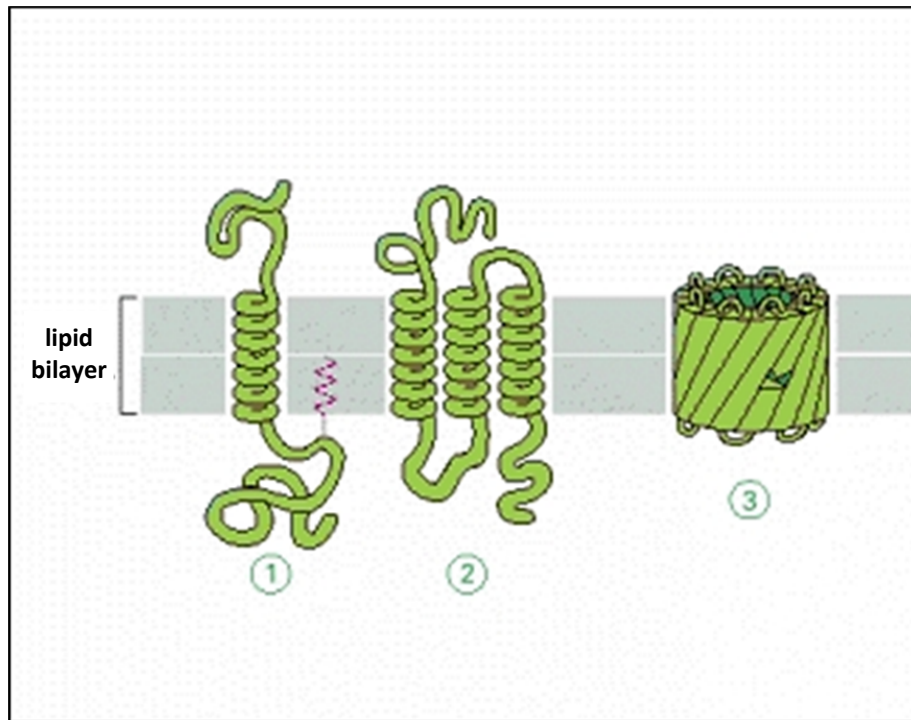


Abb. 1.2 Insertion von integralen Membranproteinen in die Lipid-Doppelschicht. Transmembranproteine können aus einer einzelnen α -Helix (1), multiplen α -Helices (2) oder mit einer β -Fass-Struktur die amphiphile Lipid-Doppelschicht der Membran durchqueren. (1) und (2) werden auch als *single-pass* und *multi-pass* bezeichnet. Die Grafik wurde aus Alberts *et al.* 2002 entnommen.

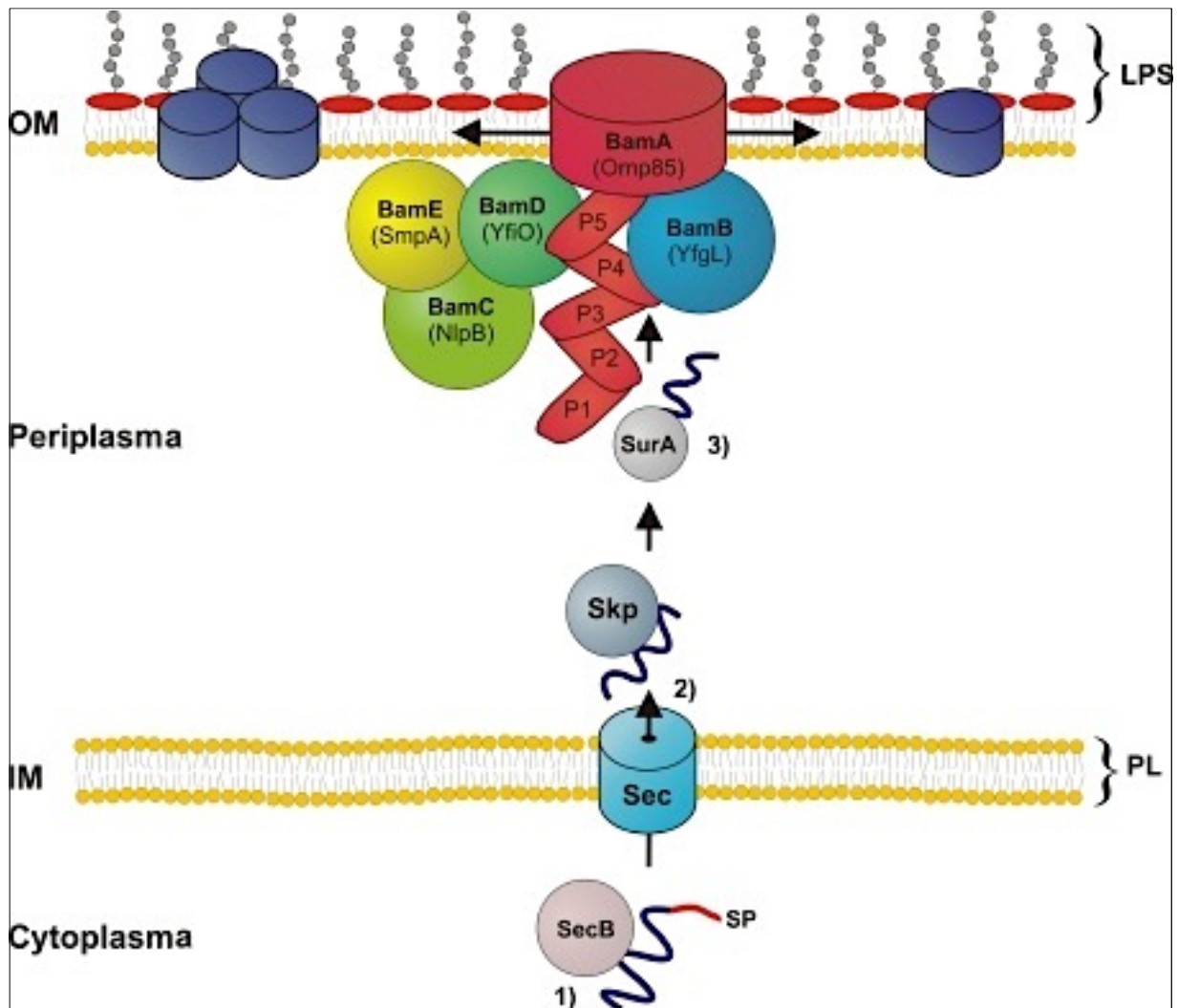


Abb. 1.3 Sekretionsweg von Membranproteinen in Gram-negativen Bakterien. OMPs werden im Cytoplasma mit einer Signalsequenz am N-Terminus synthetisiert (1), via Sec-Translocon zum Periplasma transportiert (2), von Skp und SurA gebunden (3) und mit Hilfe des BAM-Komplexes in die OM inseriert. Die Grafik wurde nach Walther *et al.* 2009 modifiziert. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich in Abschnitt 1.4. OM = Außenmembran, IM = Innenmembran, LPS = Lipopolysaccharid, PL = Phospholipid, SP = Signalpeptid.

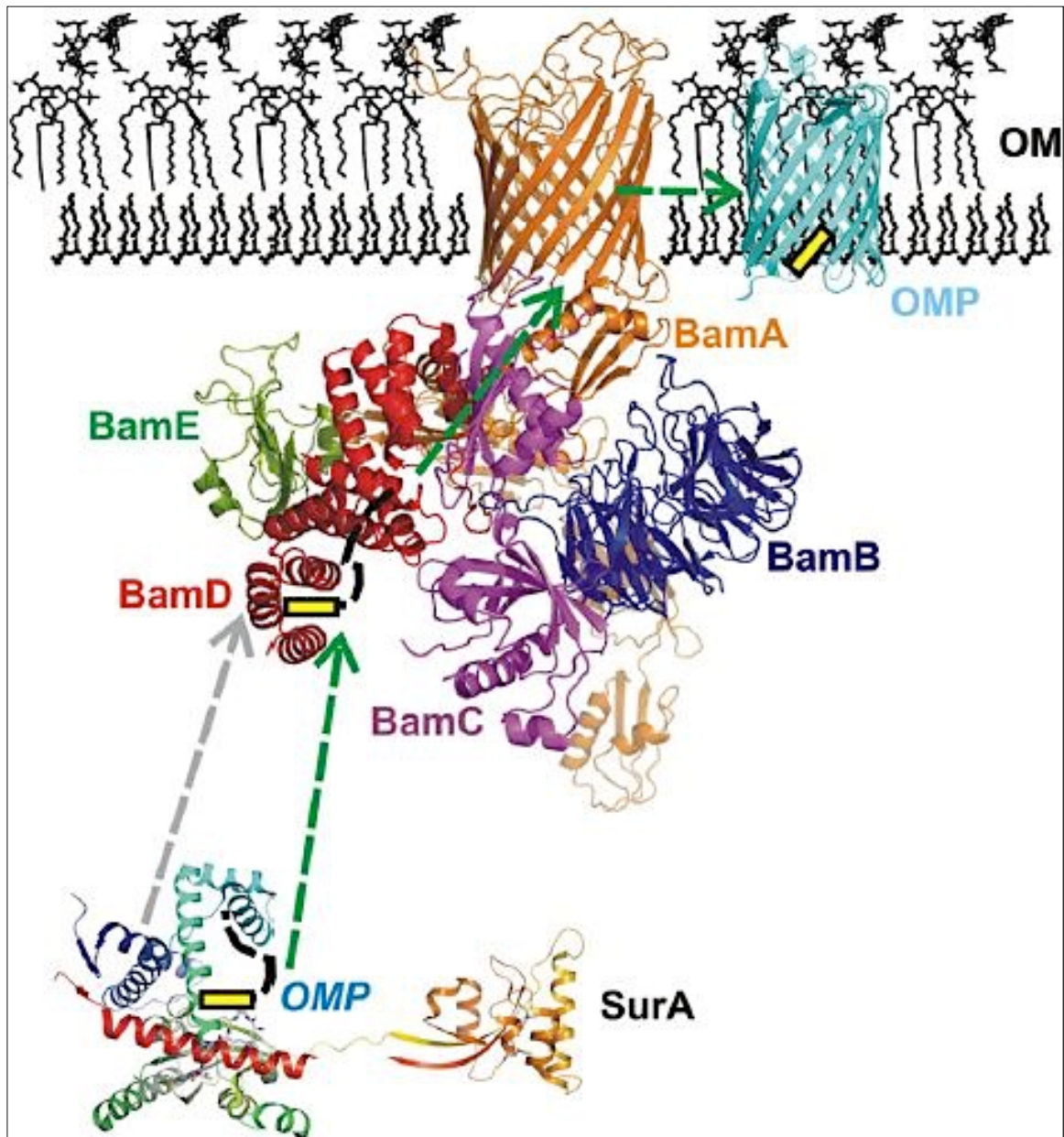


Abb. 1.4 Modell des β -barrel assembly machinery (BAM)-Komplexes. Mit Hilfe von periplasmatischen Chaperonen werden OMPs (hellblau), die in die OM inseriert und gefaltet werden sollen, zum BAM-Komplex transportiert. Dieser besteht aus fünf Proteinen, wobei BamA = orange (PDB-Struktur: 4C4V) das einzige OMP darstellt. BamB-E sind Lipoproteine, farblich markiert durch BamB = dunkelblau (PDB-Struktur: 2YH3), BamC = violett (PDB-Struktur: 2YH6, 2YH5), BamD = rot (PDB-Struktur: 2YHC) und BamE = grün (PDB-Struktur: 2YH9). Das Chaperon SurA ist in gelb dargestellt (Albrecht und Zeth 2011).

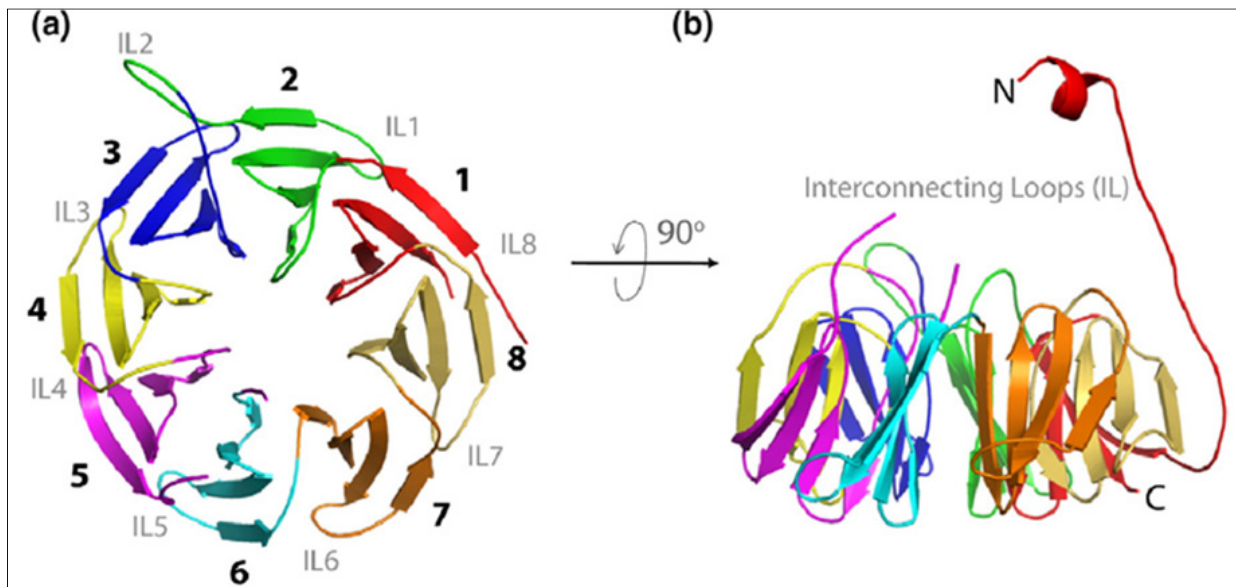


Abb. 1.5 Struktur von BamB. a) Jeder Flügel der achtsträngigen-Propellerstruktur ist aus je vier β -Faltblättern aufgebaut und durch unterschiedliche Farben hervorgehoben (1-8). b) Diese interagieren durch verbindende Schleifen miteinander (*interconnecting loops*, IL). Zur besseren Übersicht sind die N-terminalen Aminosäuren 21-40 nicht dargestellt. Die Grafik wurde aus Noinaj *et al.* 2011 entnommen.

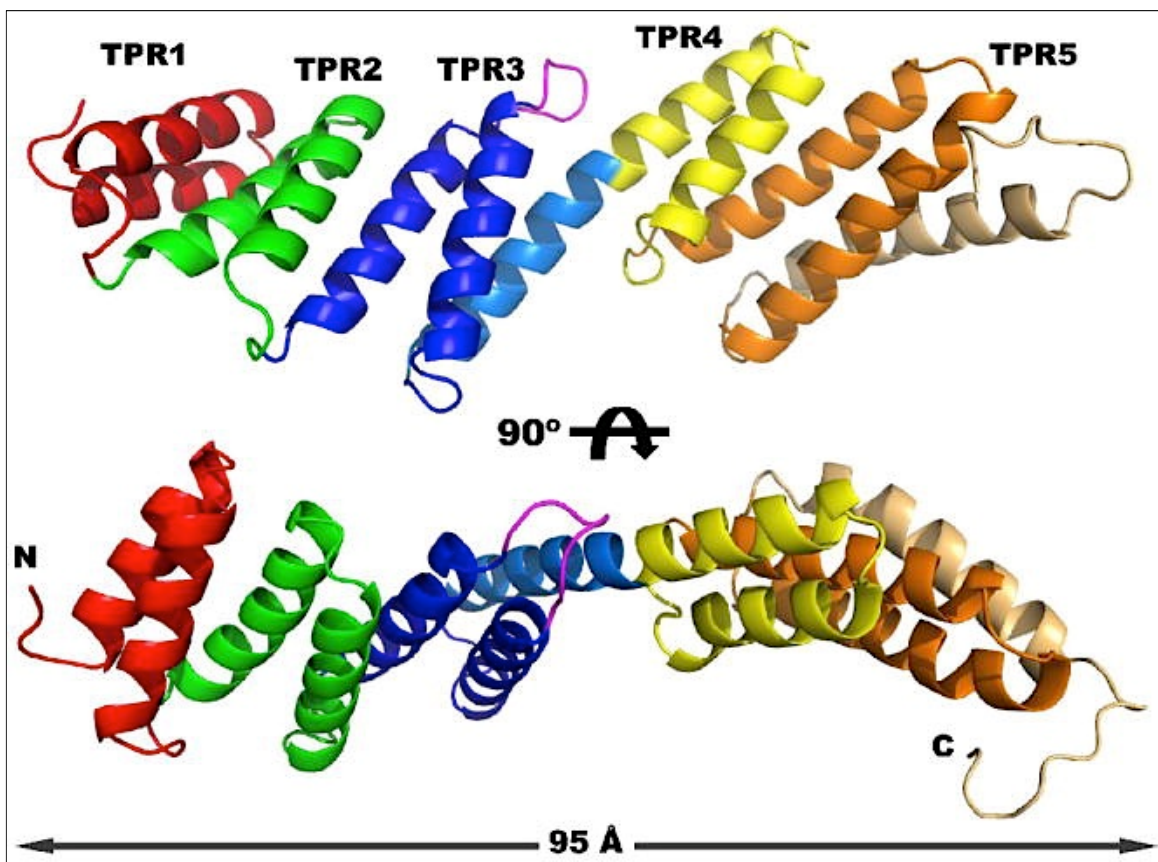


Abb. 1.6 Kristallstruktur von BamD. Die C-terminale Region beinhaltet die TPR-Motive 4 (gelb) und 5 (orange), während der N-Terminus aus den TPRs 1-3 (rot, grün, blau) aufgebaut ist. Mit TPR 3 verbunden befindet sich eine nach außen gerichtete Schleife (violett). Die Grafik wurde aus Sandoval *et al.* 2011 entnommen.

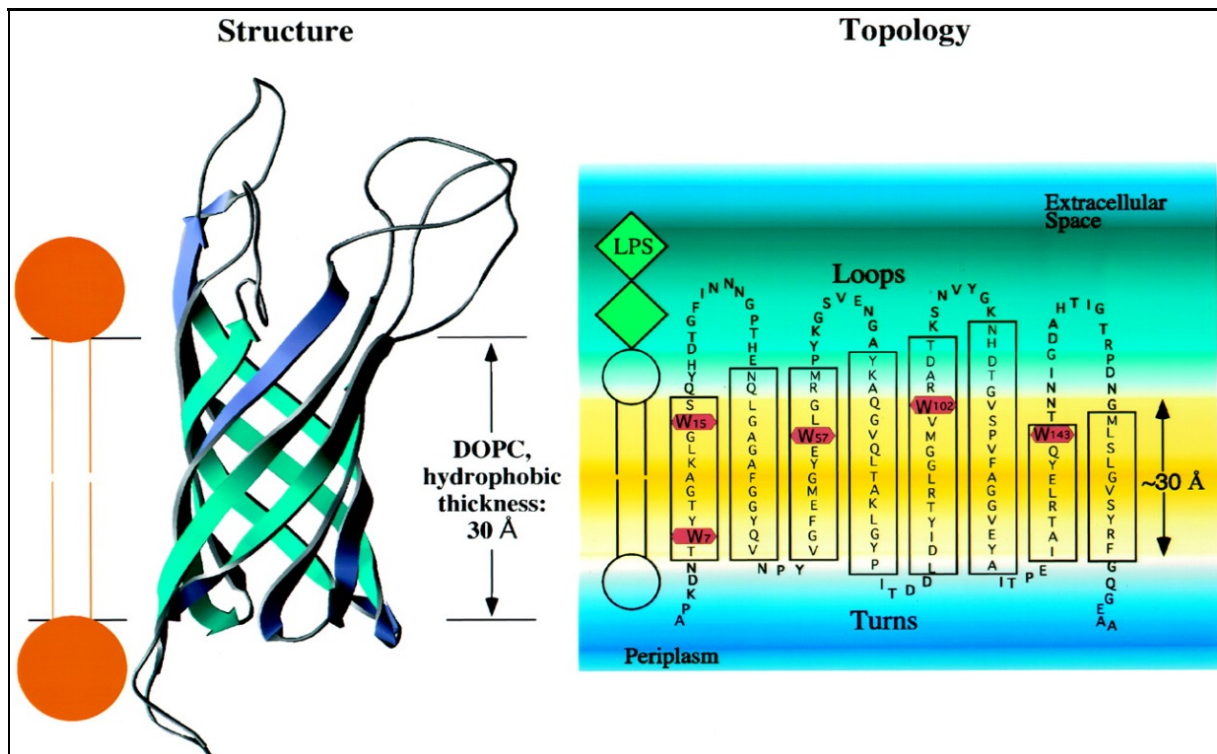


Abb. 1.7 Kernspinresonanzspektroskopie-(NMR)-Struktur der Transmembrandomäne von OmpA. Enge *turns* verbinden die acht Transmembranstränge auf der periplasmatischen Seite, während flexible Schleifen (*loops*) mit dem Protein im extrazellulären Raum interagieren (Tamm *et al.* 2001).

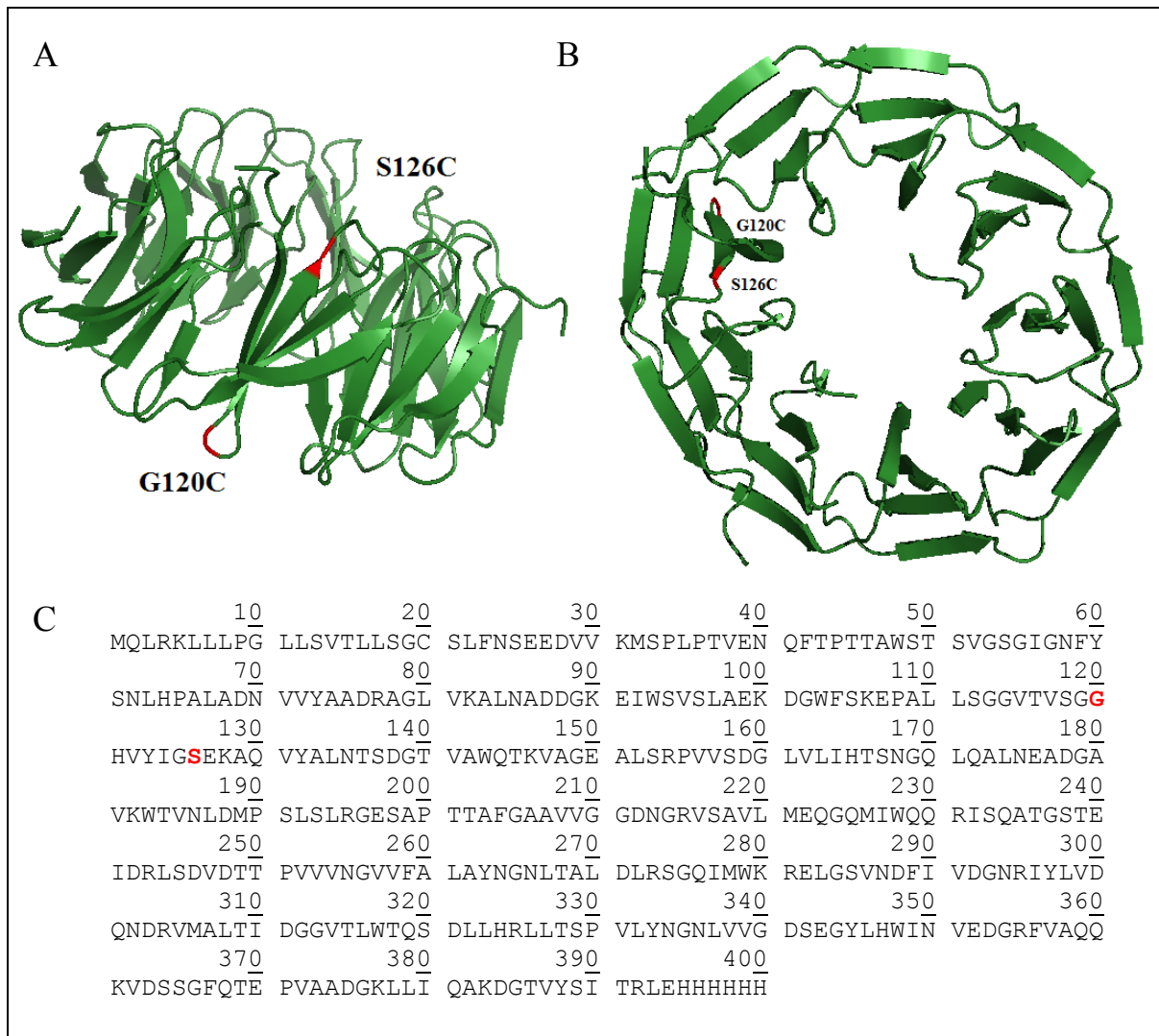


Abb. 3.1 Position der Cystein-Mutationen G120C-BamB und S126C-BamB im Protein. A und B) Die Mutationen G120C und S126C (rot) befinden sich innerhalb eines Flügels der BamB Propellerstruktur (grün) direkt gegenüber. Dargestellt ist eine Seitenansicht (A) und eine Aufsicht (B) des Proteins. Die Sekundärstruktur wurde mit der Grafiksoftware PyMol in 3D nach der PDB-Struktur 2YMS (Albrecht und Zeth, unveröffentlicht) dargestellt. C) Innerhalb der kompletten Aminosäuresequenz von BamB mit 392 Resten + His-tag sind die beiden einzelnen Mutationen G120C und S126C in rot markiert.

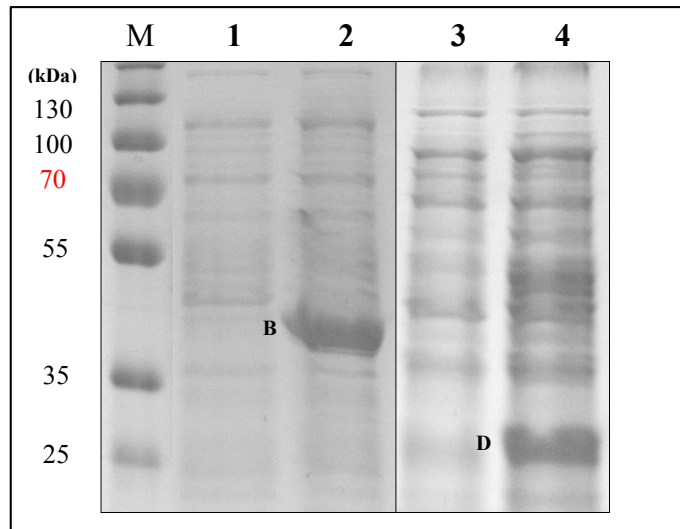


Abb. 3.2 Erfolgreiche Proteinexpression von BamB und BamD nach Zugabe von IPTG. Die Proteinexpression wurde durch 1 mM IPTG über 4 h initiiert und auf einem 12 % igen SDS-Gel analysiert. Dargestellt ist der Proteinmarker (M, Protein Ladder Prestained Plus, Thermoscientific, Waltham, USA), BamB (ca. 42 kDa, mit B markiert) vor Expression (1), nach Expression (2) und BamD (ca. 27 kDa, mit D markiert) vor Expression (3) und nach Expression (4) mit IPTG.

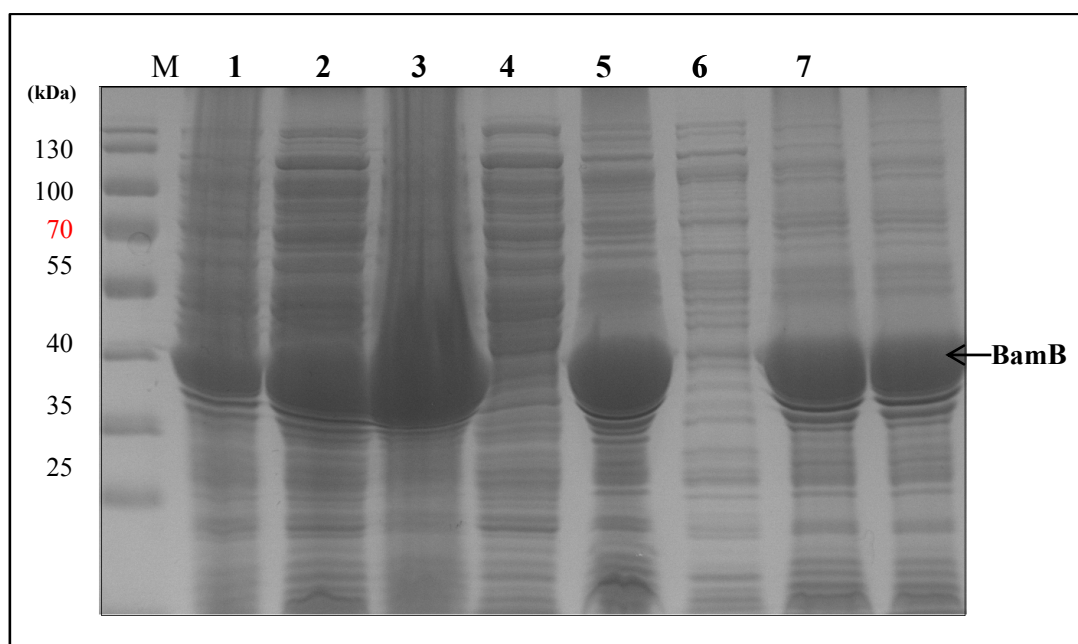


Abb. 3.3 Verschiedene Schritte der Extraktion zur Isolierung von BamB aus *E. coli*. BamB, dessen Verlauf bzw. Migration durch einen schwarzen Pfeil dargestellt ist, hat eine Molmasse von ca. 42 kDa und wurde nach dem in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Protokoll aus *E. coli* PC2889 extrahiert. Mittels entnommener Proben konnte die Gegenwart von BamB in den im Verlauf der Extraktion erhaltenen Fraktionen (Pellet bzw. Überstand) identifiziert werden. Zum Nachweis des BamB wurde dabei ein 12 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet. Die Spuren des Gels enthalten: M = Proteinmarker (Protein Ladder Prestained, Thermoscientific, Waltham, USA), 1 = Zellsuspension vor Zelllyse, 2 = gewonnene Proteine nach Zelllyse (Überstand), 3 = gewonnene Proteine nach Zelllyse (Pellet), 4 = Überstand nach Ultrazentrifugation, 5 = Pellet nach Ultrazentrifugation, 6 = Überstand nach 2. Ultrazentrifugation, 7 = Pellet nach 2. Ultrazentrifugation, 8 = Überstand nach letzter Zentrifugation.

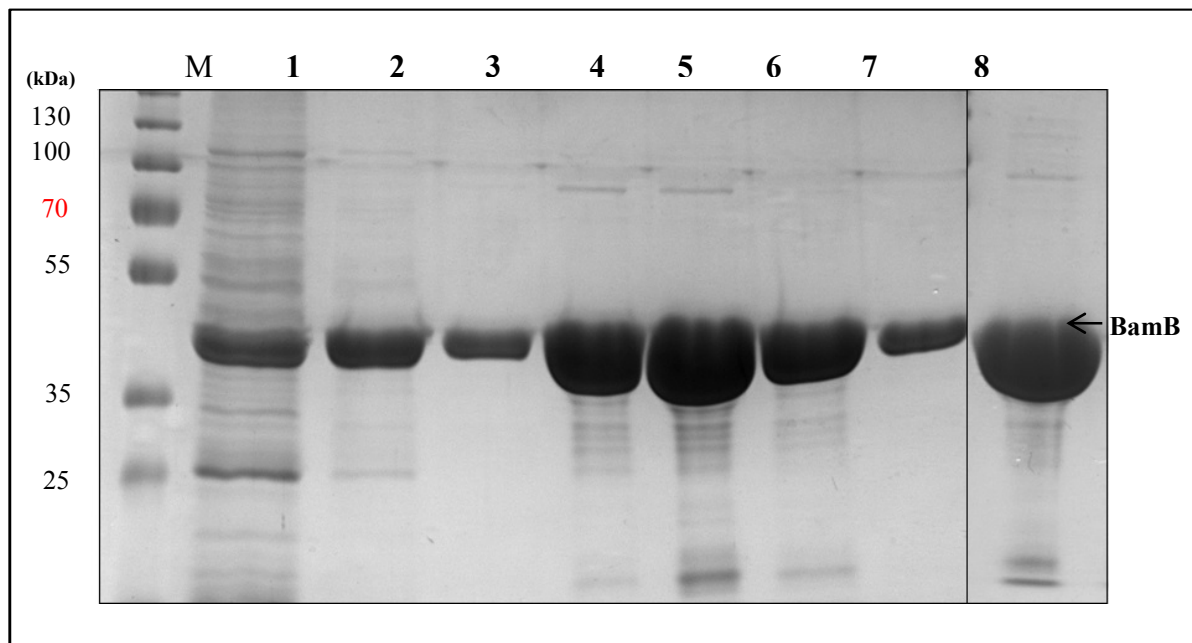


Abb. 3.4 Reinigung von BamB+His mittels Affinitätschromatographie. BamB+His, dessen Migration durch einen schwarzen Pfeil markiert ist, wurde spezifisch an eine Ni-NTA-Säule gebunden. Aufgeführt ist der Marker (M, Protein Ladder Prestained Plus, Thermoscientific, Waltham, USA), der Durchfluss nach Beladen der Säule (1), der Waschschrift (2), die Elutionen (3-7) und der *pool* aus den Elutionen (8). Die Proben wurden auf einem 12 %-igem SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert.

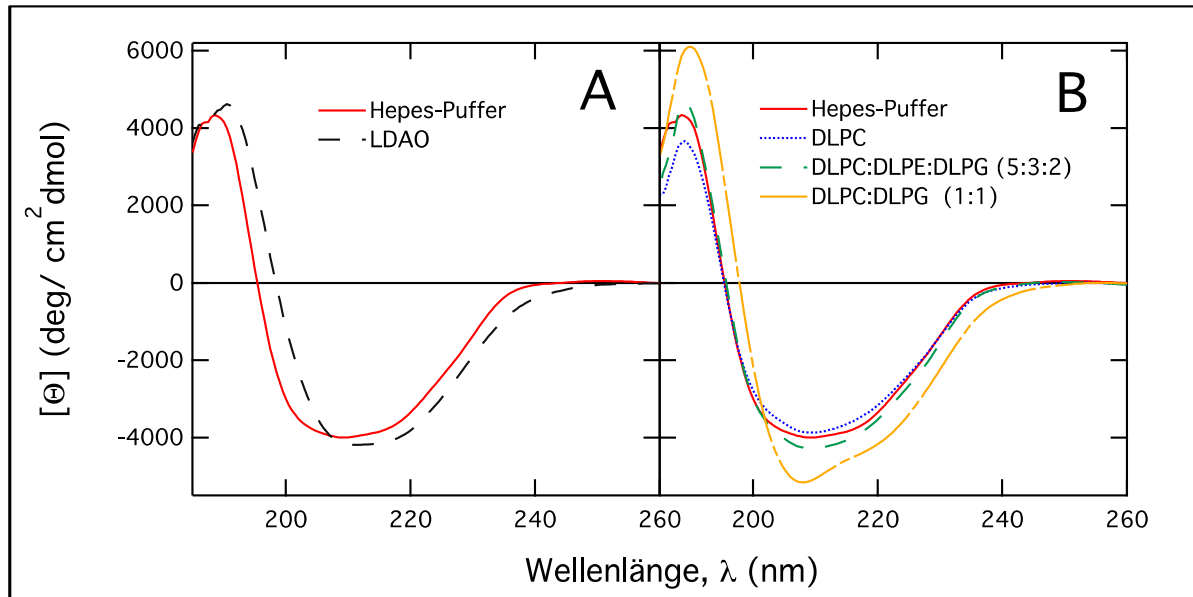


Abb. 3.5 CD-Spektren von wt-BamB in HEPES-Puffer, LDAO und verschiedenen Lipiden. Die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta](\lambda)$ wurde gegen die Wellenlänge λ geplottet. Eine Konzentration von 12 μM wt-BamB wurde in 140 μl -Ansätzen bei RT vermessen und nach Gleichung 2.3 normiert. **A)** CD-Spektrum von wt-BamB in HEPES-Puffer (5 mM HEPES, pH 7) und in Anwesenheit des zwitterionischen Detergenz LDAO (12 mM). **B)** Einfluss verschiedener Lipide (2,4 mM) auf die Faltung von wt-BamB in HEPES-Puffer bei pH 7.

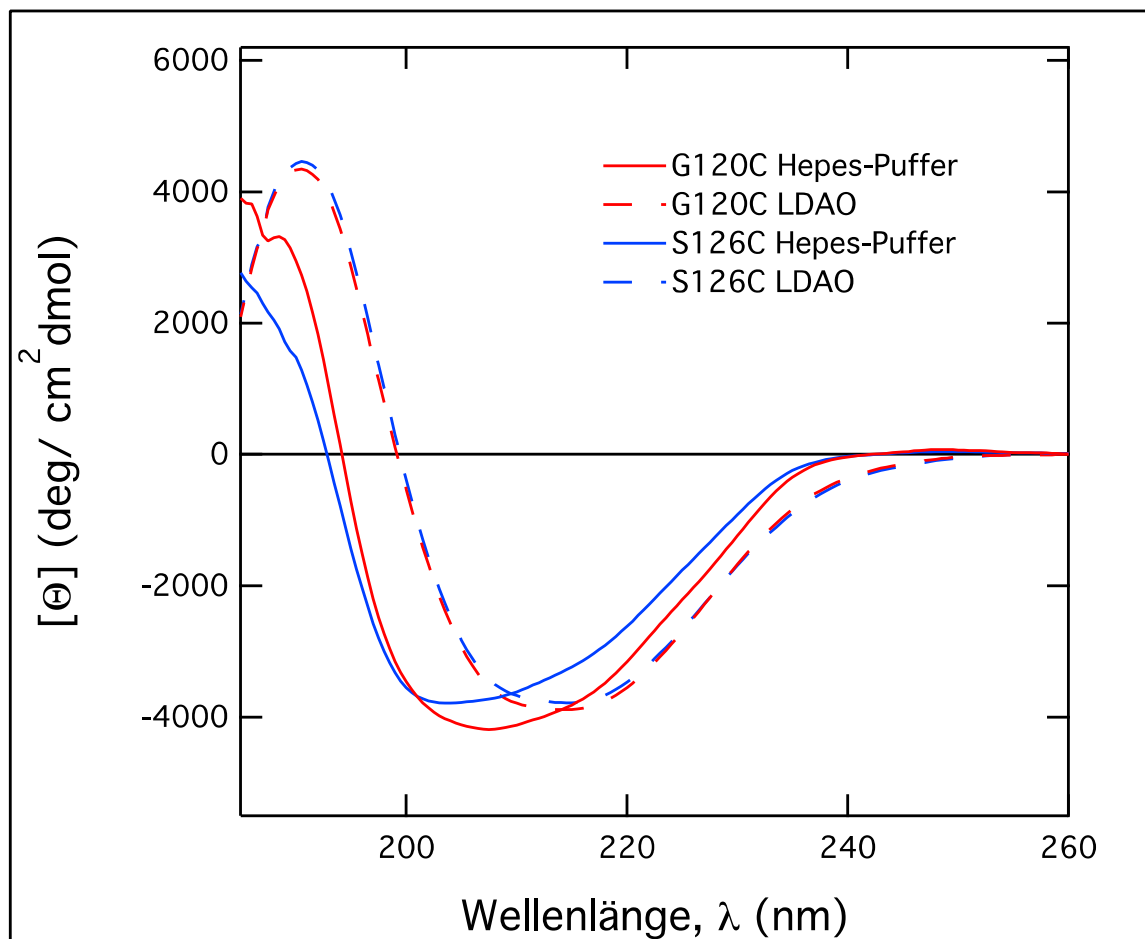


Abb. 3.6 CD-Spektrum der BamB-Mutanten G120C und S126C in HEPES-Puffer und LDAO. Die mittlere molare Elliptizität pro Rest $[\Theta](\lambda)$ wurde gegen die Wellenlänge λ geplottet. Eine Konzentration von 12 μM BamB wurde in 140 μl -Ansätzen bei RT in Anwesenheit von HEPES-Puffer (5 mM HEPES, pH 7) und dem zwitterionischen Detergenz LDAO (12 mM) vermessen und nach Gleichung 2.3 normiert.

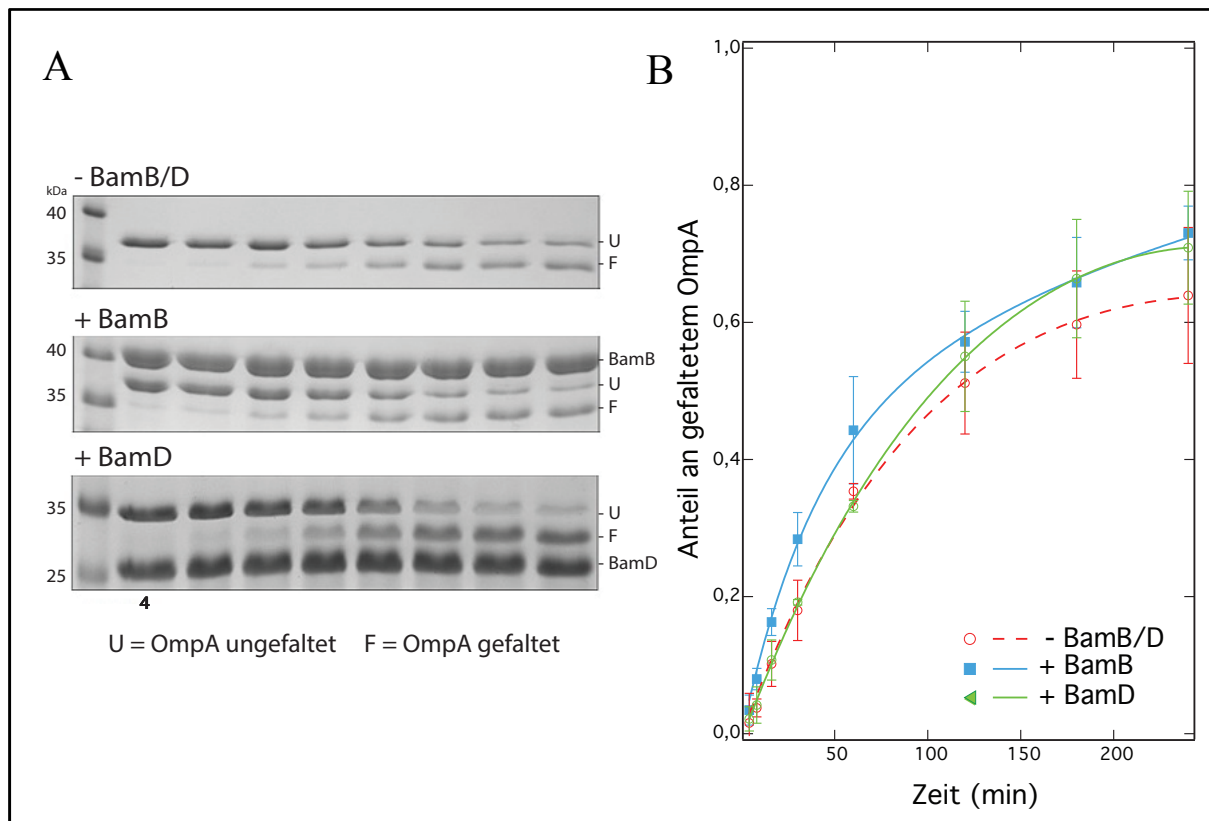


Abb. 3.7 Effekt von BamB und BamD auf die Faltung von OmpA in SUVs. **A)** In Harnstoff entfaltetes OmpA (5 μ M) wurde in Membranen der Lipidzusammensetzungen DOPC:DOPE:DOPG (SUVs) im Verhältnis 5:3:2 rückgefaltet. Es wurden drei Faltungsreaktionen parallel durchgeführt: in Abwesenheit von BamB und BamD (1. Gel von oben) oder in Anwesenheit von BamB (2. Gel) oder BamD (3. Gel). Die Konzentrationen von BamB oder BamD waren je 10 μ M. Die Kinetiken wurden in einem Zeitraum von 4-240 min bei 30 °C und pH 8 durchgeführt und die Lipide im 200-fachen molaren Überschuss zu OmpA hinzugefügt. Die entfaltete (U) und die gefaltete (F) Form von OmpA sowie die Migration auf dem Gel von BamB und BamD sind entsprechend markiert. Während die erste Spur der Gele den Proteinmarker enthält, enthalten die Spuren 2-9 die Proben, die der Faltungsreaktion zu verschiedenen Zeiten (4-240 min) entnommen wurden. Die Proben mit BamB sind auf einem 12 %-igem SDS-Gel bzw. mit BamD auf einem 15 %-igem SDS-Gel analysiert worden. **B)** Die Gele von **A** und weitere Gele von Kontrollexperimenten wurden per Densitometrie analysiert, um die Anteile des gefalteten OmpA als Funktion der Zeit unter den jeweiligen Faltungsbedingungen, d.h. in Abwesenheit (○) von BamB und BamD, in Gegenwart von BamB (■), oder in Gegenwart von BamD (◄) zu ermitteln. Die Werte ergeben sich aus drei gemittelten Messungen und wurden nach Abschnitt 2.3.2 ausgewertet.

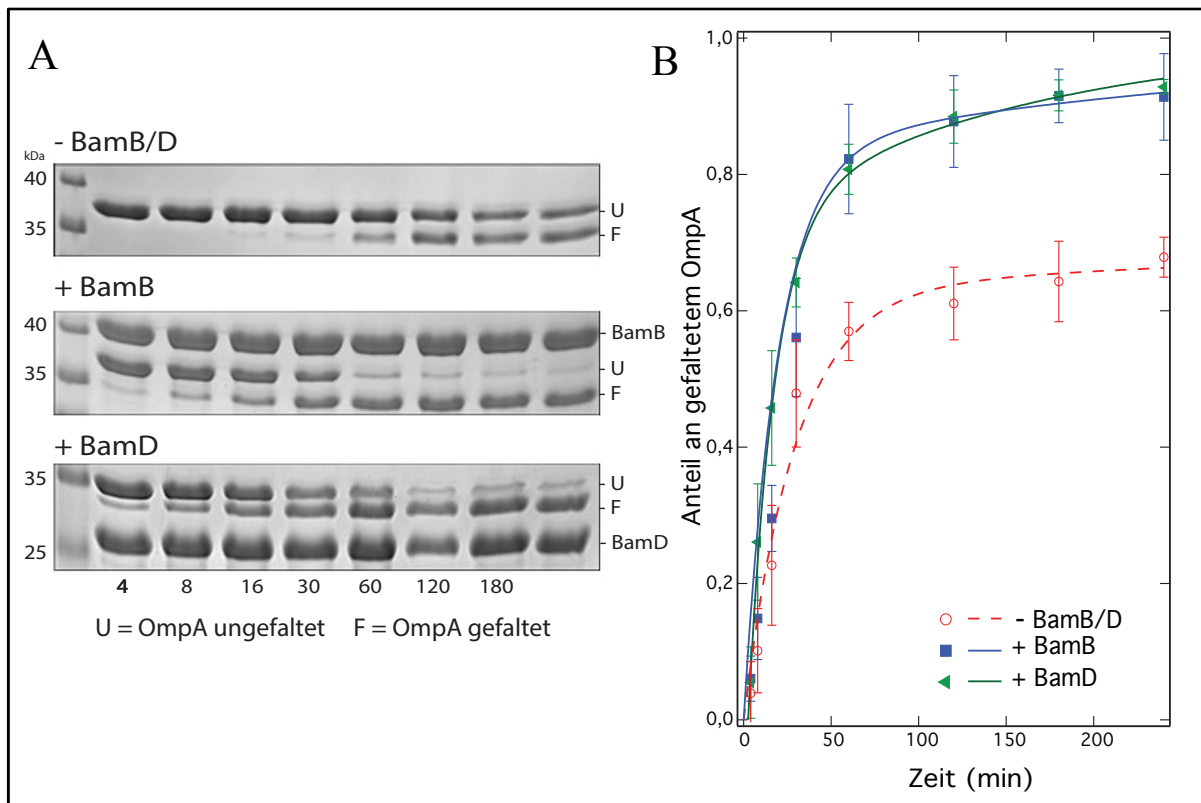


Abb. 3.8 Effekt von BamB und BamD auf die Faltung von OmpA in LUVs. **A)** In Harnstoff entfaltetes OmpA (5 μ M) wurde in Membranen der Lipidzusammensetzungen DLPC:DLPE:DLPG (LUVs) im Verhältnis 5:3:2 rückgefaltet. Es wurden drei Faltungsreaktionen parallel durchgeführt: in Abwesenheit von BamB und BamD (1. Gel von oben) oder in Anwesenheit von BamB (2. Gel) oder BamD (3. Gel). Die Konzentrationen von BamB oder BamD waren je 10 μ M. Die Kinetiken wurden in einem Zeitraum von 4-240 min bei 30 °C und pH 8 durchgeführt und die Lipide im 200-fachen molaren Überschuss zu OmpA hinzugefügt. Die entfaltete (U) und die gefaltete (F) Form von OmpA sowie die Migration auf dem Gel von BamB und BamD sind entsprechend markiert. Während die erste Spur der Gele den Proteinmarker enthält, enthalten die Spuren 2-9 die Proben, die der Faltungsreaktion zu verschiedenen Zeiten (4-240 min) entnommen wurden. Die Proben mit BamB sind auf einem 12 %-igem SDS-Gel bzw. mit BamD auf einem 15 %-igem SDS-Gel analysiert worden. **B)** Die Gele von **A** und weitere Gele von Kontrollexperimenten wurden per Densitometrie analysiert, um die Anteile des gefalteten OmpA als Funktion der Zeit unter den jeweiligen Faltungsbedingungen, d.h. in Abwesenheit (○) von BamB und BamD, in Gegenwart von BamB (■), oder in Gegenwart von BamD (◀) zu ermitteln. Die Werte ergeben sich aus drei gemittelten Messungen und wurden nach Abschnitt 2.3.2 ausgewertet.

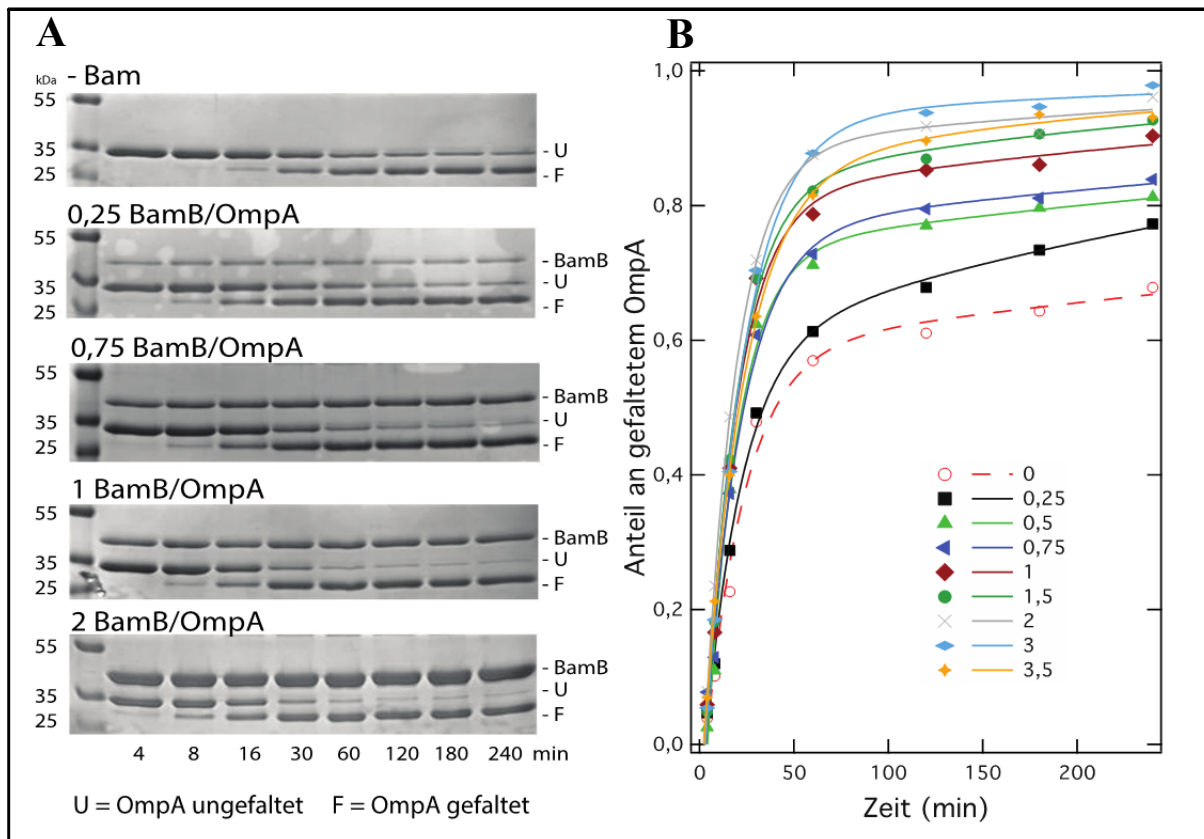


Abb. 3.9 Kinetische Analysen zur BamB/OmpA-Stöchiometrie. **A)** In Harnstoff entfaltetes OmpA (5 μ M) wurde in Membranen der Lipidzusammensetzungen DLPC:DLPE:DLPG (LUVs) im Verhältnis 5:3:2 rückgefaltet. Es wurden neun Faltungsreaktionen parallel durchgeführt: in Abwesenheit von BamB (1. Gel von oben) oder in Anwesenheit von BamB (10 μ M) und verschiedenen molaren Verhältnissen von BamB zu OmpA (nur die Gele 2-5 sind aufgeführt). Die entfaltete (U) und die gefaltete (F) Form von OmpA, der Proteinmarker (in kDa) und die Migration auf dem Gel von BamB sind entsprechend markiert. Die Kinetiken wurden in einem Zeitraum von 4-240 min bei 30 °C und pH 8 durchgeführt und die Lipide im 200-fachen Überschuss zu OmpA hinzugefügt. Die Studien sind auf einem 12 %-igen SDS-Gel aufgeführt. **B)** Die Gele von A und weitere Gele von Kontrollexperimenten wurden per Densitometrie analysiert, um die Anteile des gefalteten OmpA als Funktion der Zeit unter den jeweiligen Faltungsbedingungen, d.h. in Abwesenheit (○) von BamB und in Gegenwart von BamB zu ermitteln. Die Werte ergeben sich aus drei gemittelten Messungen und wurden nach Abschnitt 2.3.2 ausgewertet.

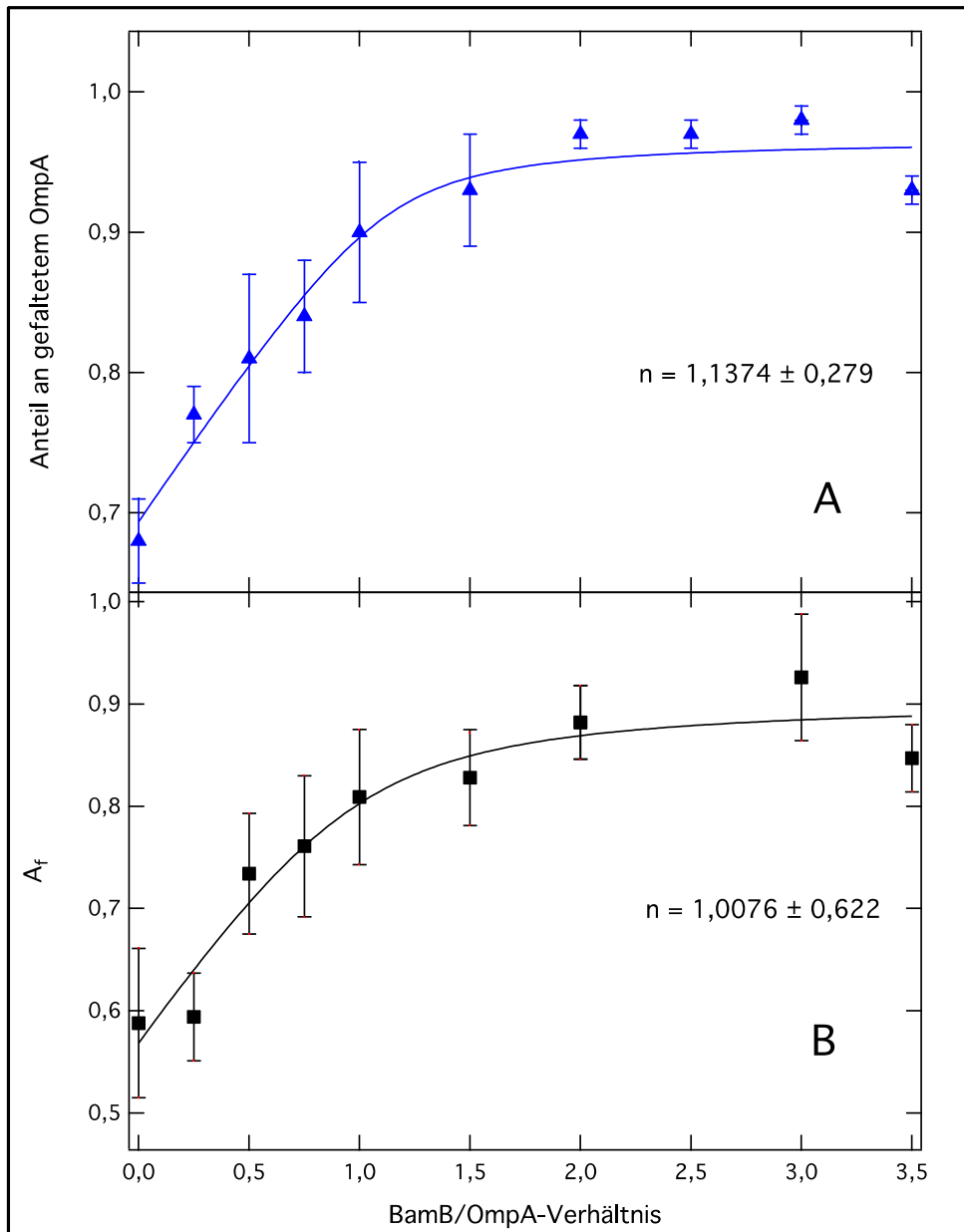


Abb. 3.10 Ermittlung der Stöchiometrie der Wechselwirkung von BamB mit OmpA. Die Kinetik der Faltung von OmpA in LUVs aus DLPC:DLPE:DLPG (5:3:2) wurde für verschiedene molare Verhältnisse von BamB zu OmpA studiert (diese Kinetiken sind in Abb. 3.9 dargestellt). Die Faltungsausbeute von OmpA (A) und der ermittelte Anteil des schnelleren Faltungsprozesses A_f (B) wurde gegen das BamB/OmpA-Verhältnis aufgetragen. Die Stöchiometrie n wurde mit Hilfe von Gleichung 2.5 berechnet. Im Bereich 2 - 3,5 nähert sich der Effekt der Gegenwart von BamB auf die Faltung des OmpA, ausgedrückt durch die Faltungsausbeute von OmpA bzw. durch A_f , asymptotisch an Grenzwerte an.

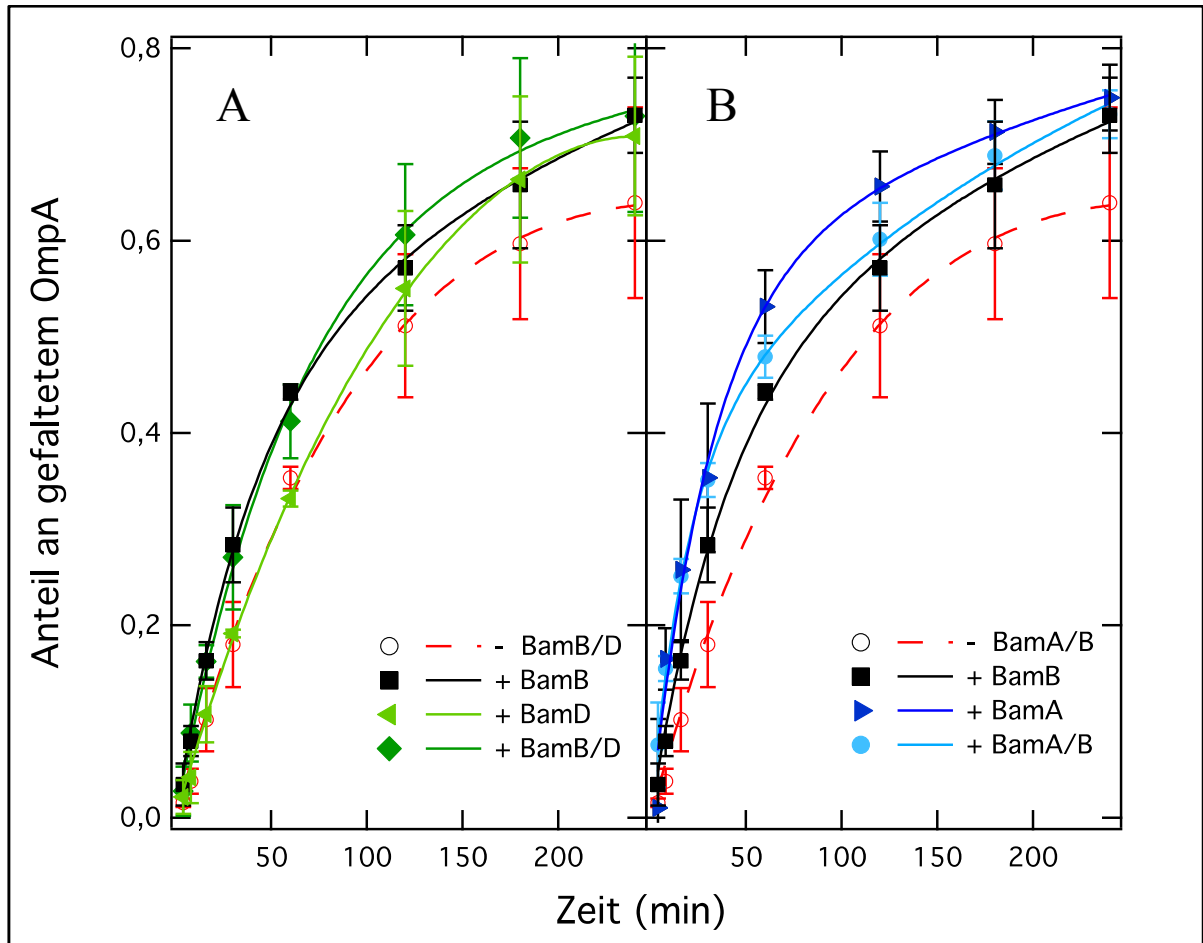


Abb. 3.11 Effekte der Lipoproteine BamB bzw. BamD und der periplasmatischen Domäne von BamA auf die Faltung von OmpA in SUVs. In Harnstoff entfaltetes OmpA (5 μ M) wurde in Membranen der Lipidzusammensetzungen DOPC:DOPE:DOPG (SUVs) im Verhältnis 5:3:2 rückgefaltet. Die Faltungsreaktionen wurden in Ab- und Anwesenheit von verschiedenen BAM-Komponenten durchgeführt. In (A) wurden vier verschiedene Ansätze analysiert: ohne BAM-Komponente (○), mit BamB (■, 10 μ M), mit BamD (▲, 10 μ M) oder mit BamB und BamD (◆, je 10 μ M). (B) zeigt die Ansätze: ohne BAM-Komponente (○), mit BamB (■, 10 μ M), mit der periplasmatischen Domäne von BamA (►, 10 μ M) oder mit BamB und der periplasmatischen Domäne von BamA (●, je 10 μ M). Die Kinetiken wurden in einem Zeitraum von 4-240 min bei 30 °C und pH 8 durchgeführt und die Lipide im 200-fachen Überschuss zu OmpA hinzugefügt. Die Kinetiken von BamB und BamA sind auf einem 12 %-igem SDS-Gel und BamD auf einem 15 %-igem SDS-Gel aufgeführt und wurden nach Abschnitt 2.3.2 ausgewertet.

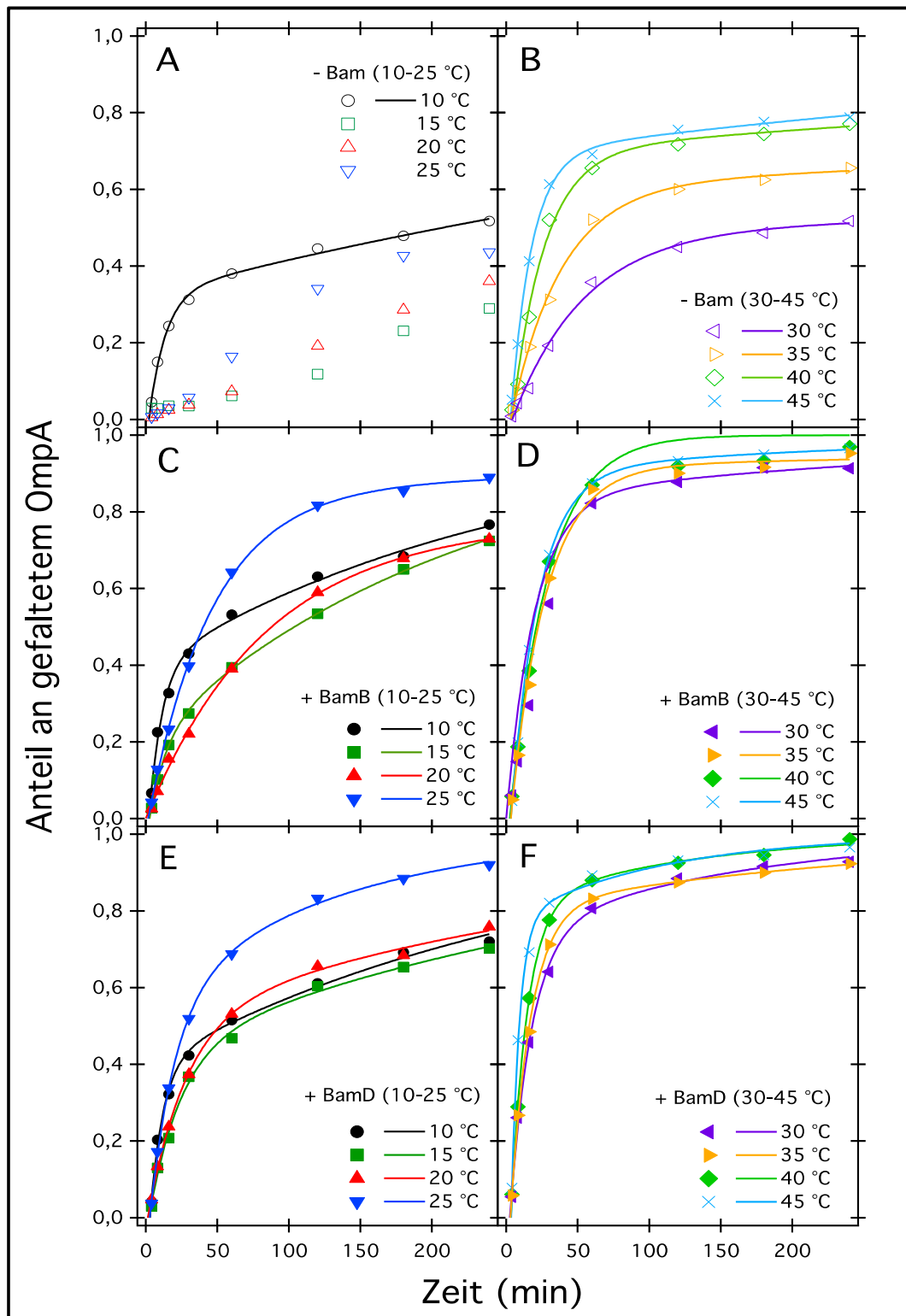


Abb. 3.12 Kinetische Analysen zur Ermittlung der Aktivierungsenergie der Faltung von OmpA in Abhängigkeit von BamB und BamD in DLPC:DLPE:DLPG (5:3:2). In Harnstoff entfaltetes OmpA (5 μ M) wurde in Membranen der Lipidzusammensetzungen DLPC:DLPE:DLPG (LUVs) im Verhältnis 5:3:2 rückgefaltet. Es wurden drei Faltungsreaktionen parallel durchgeführt: in Abwesenheit von BamB und BamD (A und B) oder in Anwesenheit von BamB (C und D) oder BamD (E und F). Die Konzentrationen von BamB oder BamD waren je 10 μ M. Die Faltungskinetiken wurden in einem Zeitraum von 4-240 min bei verschiedenen Temperaturen (10 bis 45 °C) und bei pH 8 gemessen. Das molare Lipid/OmpA-Verhältnis war 200. Die Studien wurden nach Abschnitt 2.3.2 ausgewertet. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Messungen gemittelt.

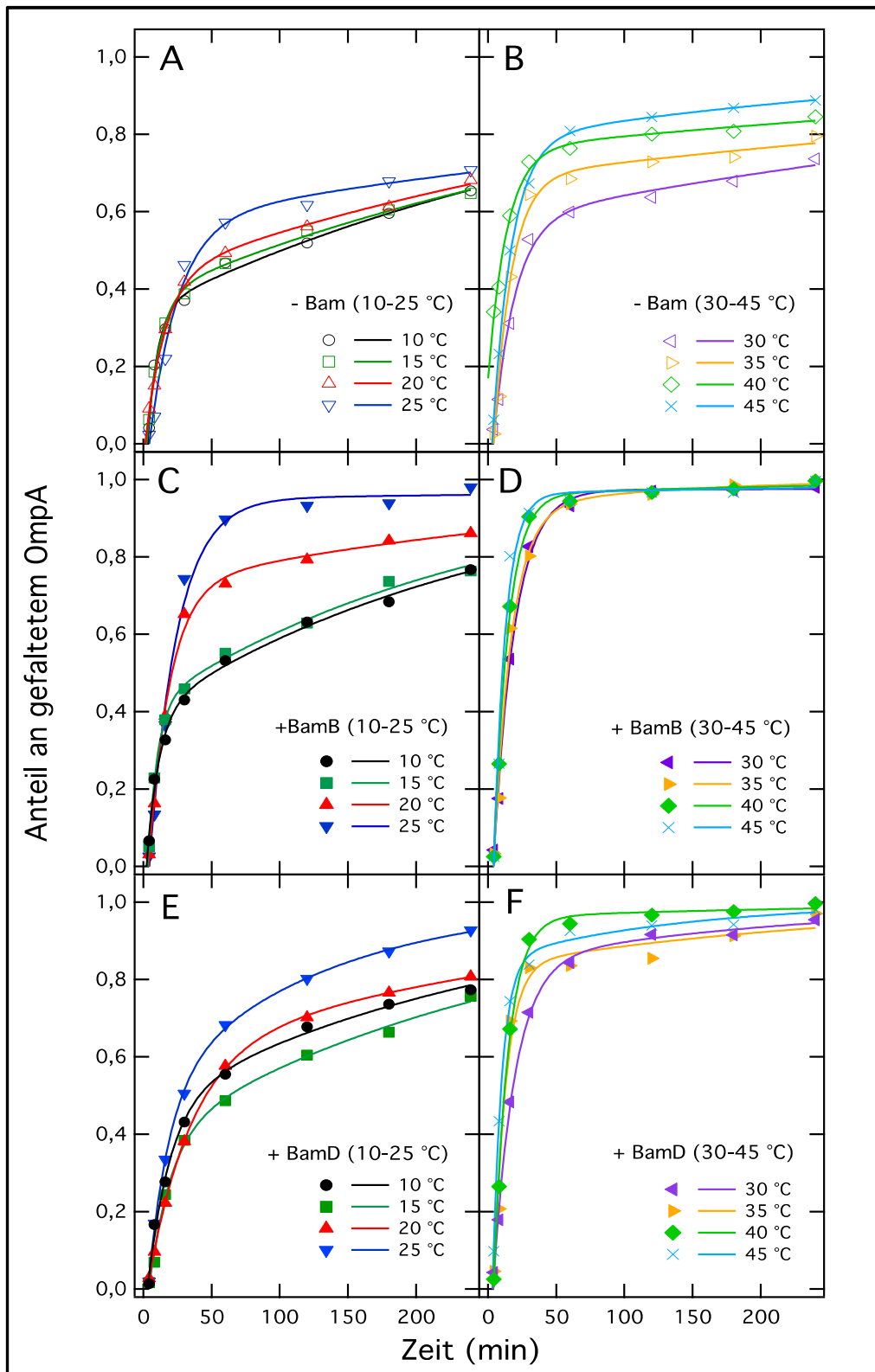


Abb. 3.13 Kinetische Analysen zur Ermittlung der Aktivierungsenergie der Faltung von OmpA in Abhängigkeit von BamB und BamD in DLPC. In Harnstoff entfaltetes OmpA (5 μ M) wurde in Membranen aus DLPC (LUVs) rückgefaltet. Es wurden drei Faltungsreaktionen parallel durchgeführt: in Abwesenheit von BamB und BamD (A und B) oder in Anwesenheit von BamB (C und D) oder BamD (E und F). Die Konzentrationen von BamB oder BamD waren je 10 μ M. Die Faltungskinetiken wurden in einem Zeitraum von 4-240 min bei verschiedenen Temperaturen (10 bis 45 °C) und bei pH 8 gemessen. Das molare Lipid/OmpA-Verhältnis war 200. Die Studien wurden nach Abschnitt 2.3.2 ausgewertet. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Messungen gemittelt.

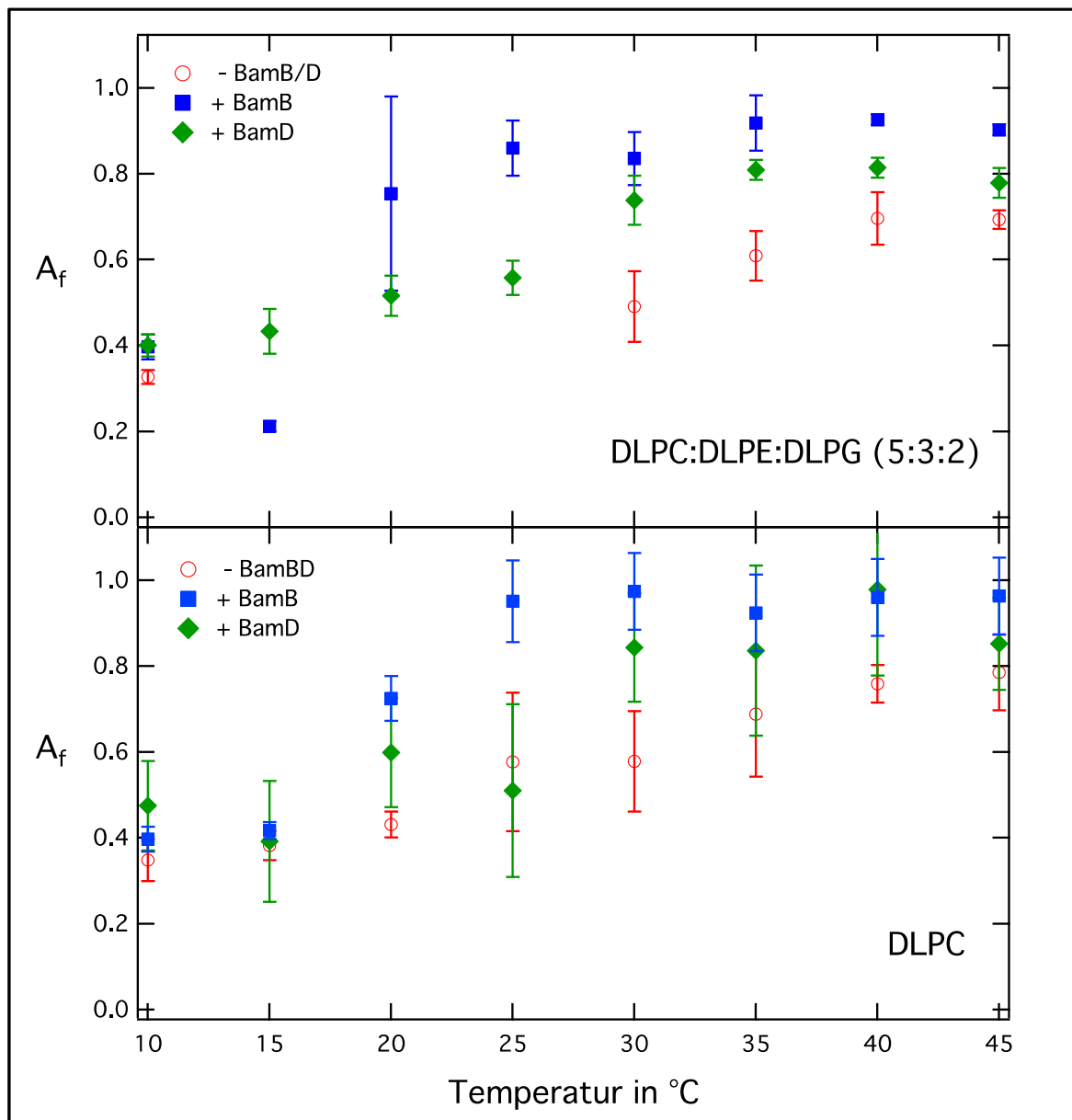


Abb. 3.14 Anteil an der schnellen Faltungsphase A_f als Funktion der Temperatur in An- und Abwesenheit von BamB bzw. BamD. Vergleichend ist A_f für zwei verschiedene Lipidzusammensetzungen mit DLPC:DLPE:DLPG (5:3:2) (aus Tabelle 3.6) und DLPC (aus Tabelle 3.7) dargestellt, die im 200-fachen Überschuss zu OmpA hinzugefügt wurden. Das Experiment erfolgte bei einem pH von 8. A_f -Werte dessen Standardabweichungen höher sind als der eigentliche gemessene Wert wurden nicht berücksichtigt.

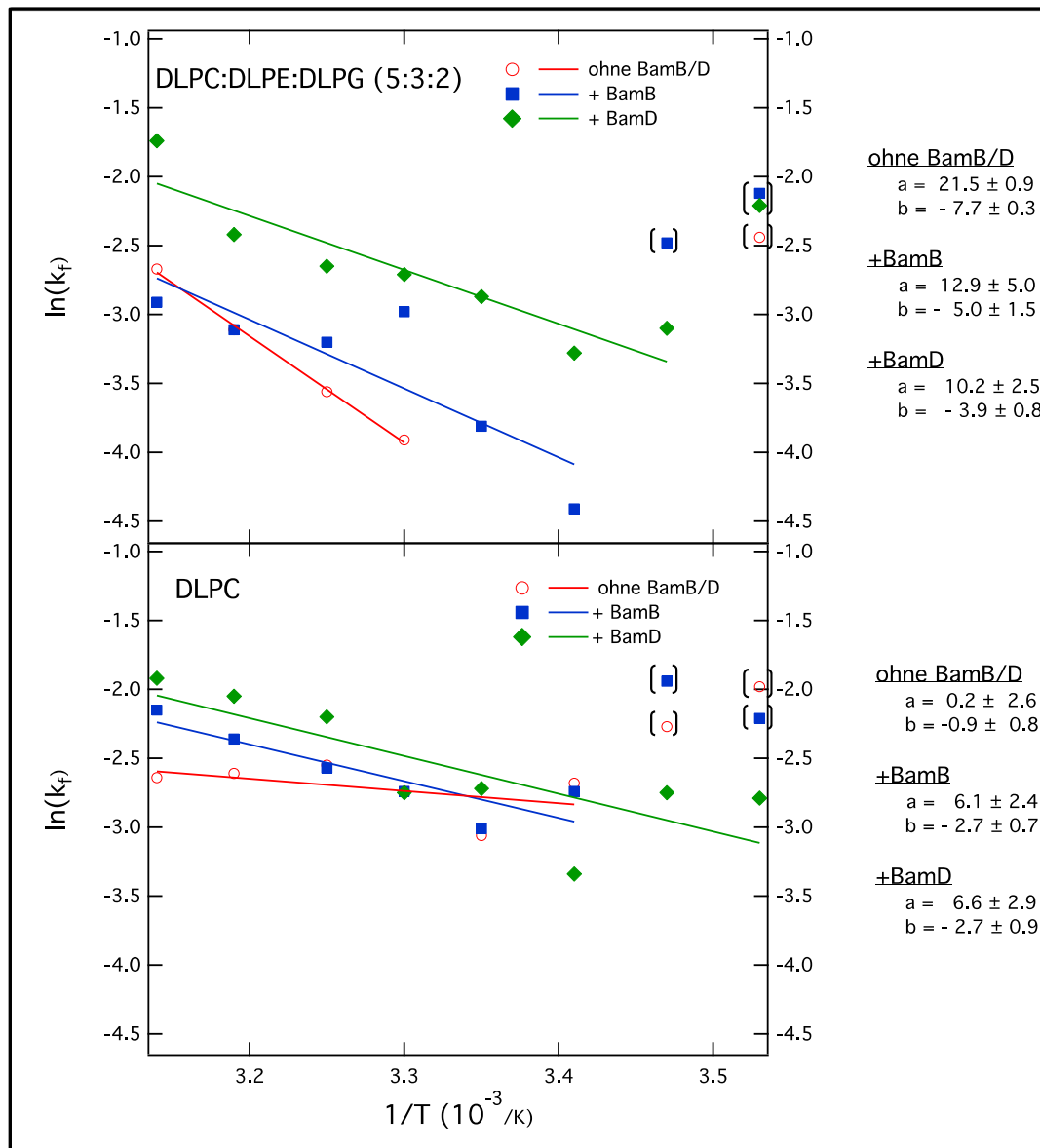


Abb. 3.15 Arrhenius-Plot zur Bestimmung der Aktivierungsenergie E_A des Faltungsprozesses von OmpA in die Membran. Das Experiment ist in den Legenden der Abb. 3.11 und Abb. 3.12 näher beschrieben und wurde in DLPC:DLPE:DLPG im Verhältnis 5:3:2 (obere Grafik) und DLPC (untere Grafik) durchgeführt. Die ermittelten k_f -Daten und Temperaturen zur Darstellung dieser Grafik wurden den Tabellen 3.6 und 3.7 entnommen. Die Studien wurden nach Gleichung 3.1 ausgewertet, $\ln(k_f)$ reziprok gegen die Temperatur geplottet und nach $y = a + bx$ gefittet. Ausgenommen sind die eingeklammerten Punkte. Dies wurde im vorigen Abschnitt begründet. Die ermittelten $\ln(k_f)$ -Werte sind ebenfalls in den Tabellen 3.6 und 3.7 aufgeführt.

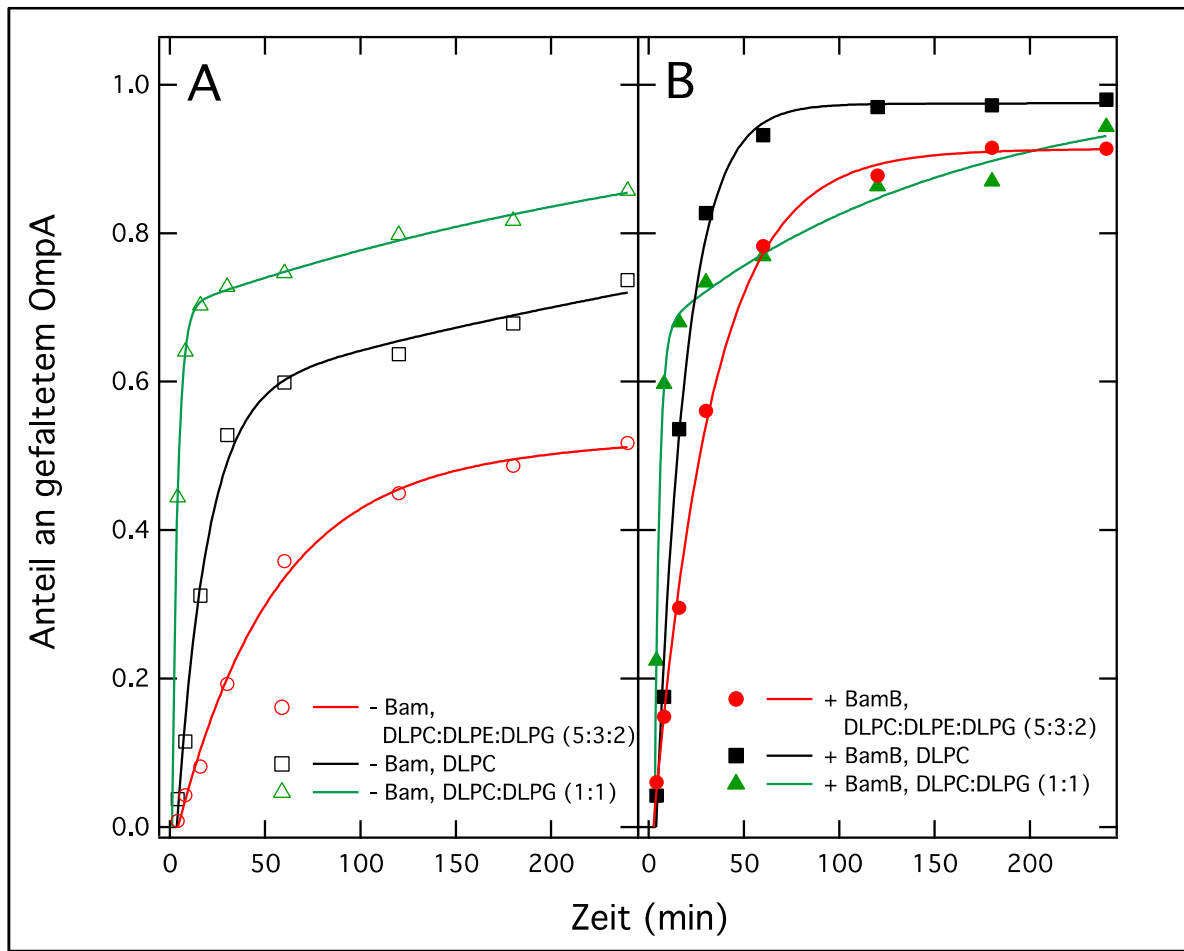


Abb. 3.16 Faltung von OmpA in LUVs verschiedener Lipidzusammensetzungen. In Harnstoff entfaltetes OmpA (5 μ M) wurde in Abwesenheit (A) bzw. in Anwesenheit (B) von BamB (10 μ M) in Membranen verschiedener Lipidzusammensetzungen (LUVs) rückgefaltet. Verwendet wurde das Lipid DLPC (□ bzw. ■), eine 1:1 Lipidzusammensetzung aus DLPC und DLPG (△ bzw. ▲) und eine 5:3:2 Lipidzusammensetzung aus DLPC:DLPE:DLPG (○ bzw. ●). Die Kinetiken wurden in einem Zeitraum von 4-240 min bei 30 °C und pH 8 durchgeführt und die Lipide im 200-fachen Überschuss zu OmpA hinzugefügt. Die Studien wurden nach Abschnitt 2.3.2 ausgewertet.

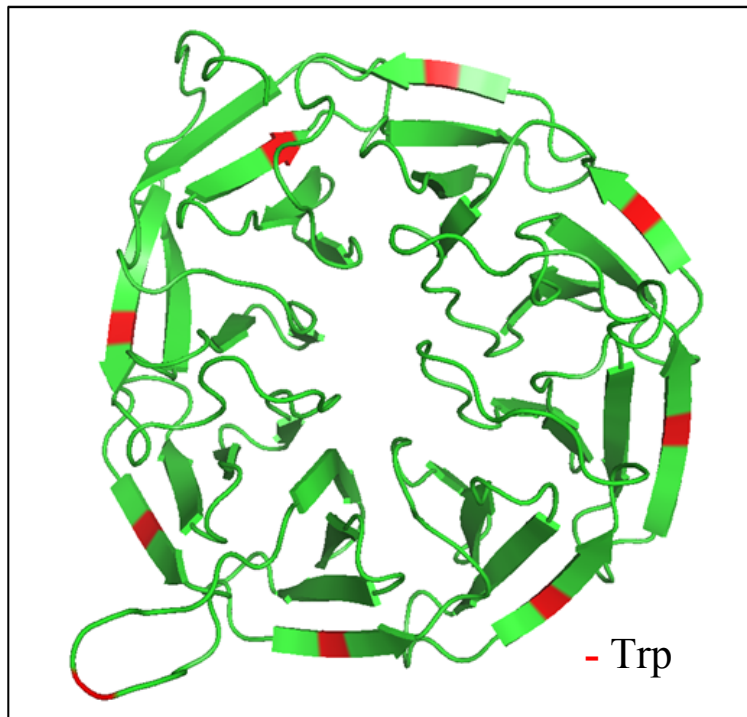


Abb. 3.17 Kristallstruktur von BamB und die Position der Tryptophane im Protein. Jeder Flügel der β -Propellerstruktur (grün), der aus je vier β -Faltblättern aufgebaut ist, besitzt exakt einen Trp-Rest (in rot markiert). Zusätzlich enthält der IL2, eine β -Schleife, einen einzelnen Trp-Rest. Die Sekundärstruktur wurde mit der Grafiksoftware PyMol in 3D nach der PDB-Struktur 2YH3 (Albrecht und Zeth 2011) erstellt.

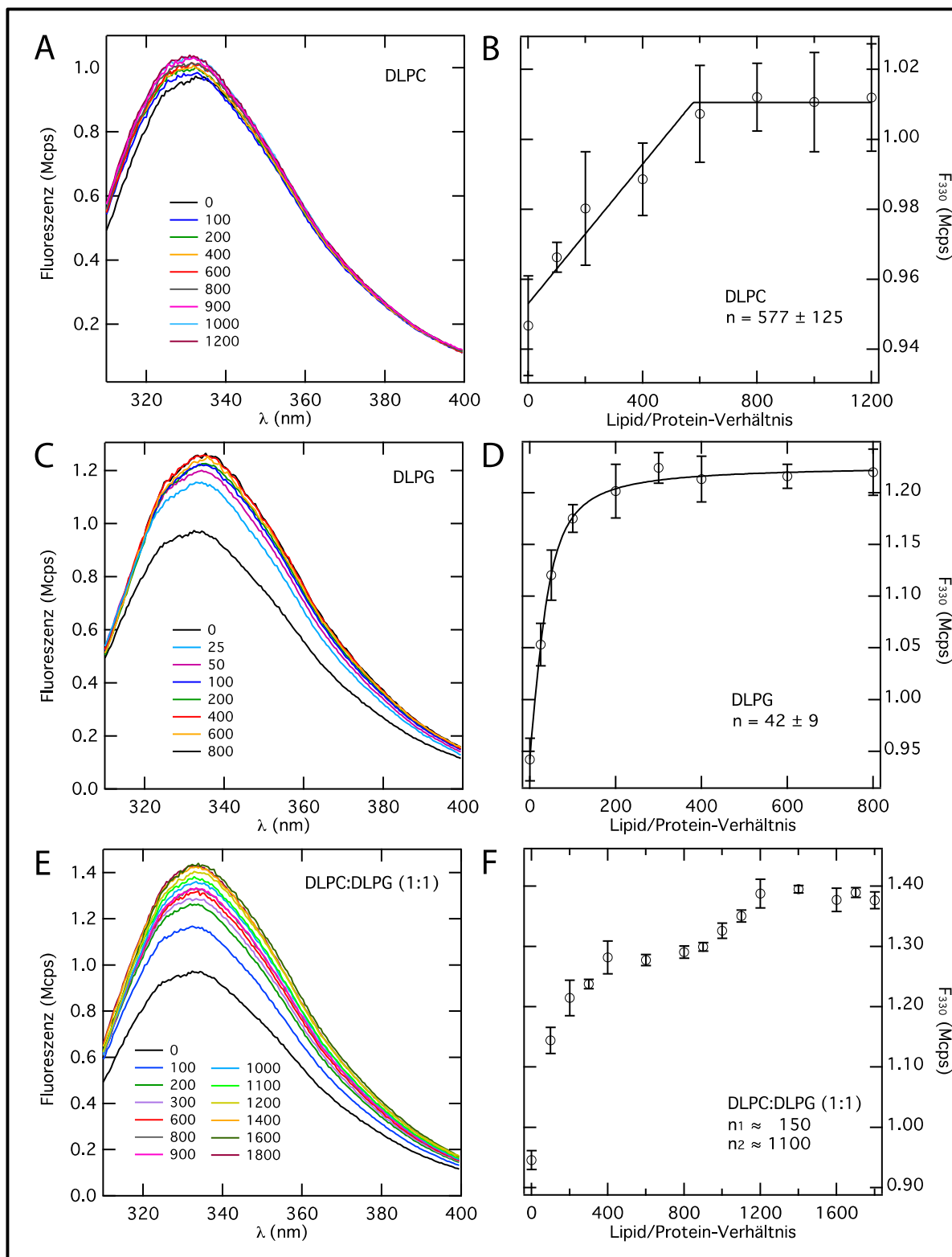


Abb. 3.18 Fluoreszenzspektren von BamB zeigen dessen Interaktion mit verschiedenen Lipidmembranen. Die Spektren von BamB zeigen eine Abhängigkeit vom molaren Lipid/BamB Verhältnis. Verwendet wurden Membranen aus DLPC (A, B), DLPG (C, D) und DLPC:DLPG im Verhältnis 1:1 (E, F), die in verschiedenen molaren Überschüssen zu BamB hinzugefügt wurden (siehe farbig markierte — Legenden). Die Trp-Fluoreszenz von 0,33 μ M BamB wurde bei 295 nm angeregt und die Fluoreszenzintensität in Glycinpuffer bei pH 8 und 25 $^{\circ}$ C ermittelt. Diese wurde gegen die Wellenlänge aufgetragen und in einem Bereich zwischen 310 und 400 nm vermessen (A, C, E). Das Fluoreszenzmaximum liegt bei ca. 330 nm. Die Fluoreszenzintensität bei dieser Wellenlänge wurde in B, D und F gegen das molare Lipid/Protein-Verhältnis geplottet. Die Stöchiometrie n wurde durch eine Kurvenanpassung von Gleichung 2.5 an die gemessenen Daten identifiziert. Mit $n = 42 \pm 9$ erweist sich BamB am affinsten gegenüber DLPG.

Einbau und Faltung von β -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