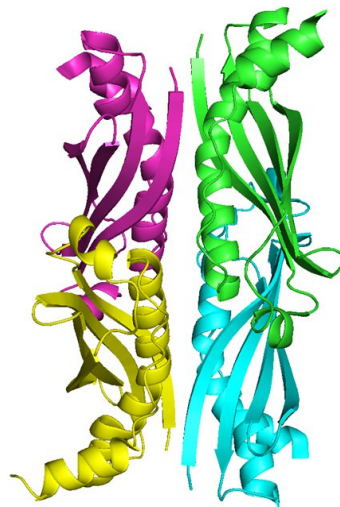


# Versuche zur Proteinsekretion bei *Escherichia coli*: SecB

Dem Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern  
zur Erlangung des akademischen Grades  
“Doktor der Naturwissenschaften”  
genehmigte

**DISSERTATION**

(D 386)



vorgelegt von

**Dipl.-Biol. Anja Baron**

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

Wissenschaftliche Aussprache: 01. Juni 2017

*Für meine Eltern*

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.“*

**Johann Wolfgang von Goethe (1759-1832)**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 2004 bis Juli 2009 und von August 2011 bis August 2012 im Fachbereich Chemie, Arbeitskreis Biochemie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 01. Juni 2017

**Promotionskommission**

Vorsitzender: Prof. Dr. Werner Thiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Antonio Pierik

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Chaperone . . . . .	1
1.2	Proteintransport in <i>Escherichia coli</i> . . . . .	4
1.2.1	Signalsequenz . . . . .	5
1.2.2	Tat-abhängiger Proteintransport . . . . .	6
1.2.3	Sec-abhängiger Proteintransport . . . . .	6
1.3	Das Chaperon SecB . . . . .	12
1.3.1	Die Struktur von SecB . . . . .	12
1.3.2	Wechselwirkungen von SecB . . . . .	13
1.4	Das Substrat preMBP . . . . .	16
1.5	Das Modellsubstrat BPTI . . . . .	17
1.6	EPR-Spektroskopie . . . . .	19
1.6.1	Theoretische Grundlagen . . . . .	20
1.6.2	Die Hyperfeinstruktur . . . . .	22
1.6.3	EPR-Spektren immobilisierter Proben und Abstandsmessungen . . . . .	22
1.6.4	Gepulste EPR-Messungen: <i>Double Electron Electron Resonance</i> . . . . .	25
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>Eigene Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>30</b>
3.1	Expression und Isolierung von SecB mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie . . . . .	30
3.2	Umklonierung der SecB-Gene in pET20b(+) . . . . .	34
3.2.1	Primerdesign . . . . .	34
3.2.2	Amplifizierung der SecB-Gene . . . . .	35
3.2.3	Charakterisierung und Ligation der SecB-Gene . . . . .	36
3.2.4	Kontrollverdau und Charakterisierung der SecB-Expressionsvektoren . . . . .	37
3.3	Ortsgerichtete Mutagenese . . . . .	38
3.4	Expression und Isolierung von SecB mittels Nickel-Affinitätschromatographie . . . . .	42
3.4.1	Aufreinigung unter nativen Bedingungen . . . . .	44
3.4.2	Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen . . . . .	45

---

3.4.3	Thrombinspaltung . . . . .	47
3.5	Expression und Isolierung von preMBP . . . . .	48
3.6	Das Modellsubstrat BPTI . . . . .	51
3.6.1	Chemische Modifizierung durch Carboxyamidomethylierung . . .	51
3.6.2	Fluoreszenzlabeling von BPTI mit Fluoresceinisothiocyanat . . .	53
3.6.3	Expression und Isolierung von all-Ala-BPTI . . . . .	55
3.6.4	Aufreinigung von all-Ala-BPTI mittels Nickelaffinitätschromato- graphie . . . . .	56
3.7	Nachweis des SecB-preMBP-Komplexes mittels HPLC . . . . .	58
3.8	Nachweis des SecB-BPTI-Komplexes mittels Fluoreszenz . . . . .	63
3.9	<i>Molecular Modeling</i> von SecB . . . . .	64
3.10	<i>Site-Directed Spinlabeling</i> der SecB-Mutanten . . . . .	66
3.10.1	Massenspektroskopische Analyse von spingelabeltem SecB . . .	67
3.11	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i> -Messungen . . . . .	68
3.11.1	Raumtemperaturmessungen . . . . .	69
3.11.2	Tieftemperaturmessungen . . . . .	75
3.11.3	DEER-Messungen . . . . .	79
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>86</b>
5.1	Materialien . . . . .	86
5.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien . . . . .	86
5.1.2	Chemikalien . . . . .	88
5.1.3	Säulen und Säulenmaterialien . . . . .	89
5.1.4	Verwendete Puffer und Lösungen . . . . .	90
5.1.5	<i>E. coli</i> -Stämme . . . . .	90
5.1.6	Enzyme . . . . .	91
5.1.7	Protein- und DNA-Marker . . . . .	91
5.2	Allgemeine Arbeitsmethoden . . . . .	92
5.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmungen . . . . .	92
5.2.2	Proteinaufkonzentrierung . . . . .	93
5.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese . . . . .	93
5.3	Gentechnische Arbeitsmethoden . . . . .	95
5.3.1	Sterilisation von Geräten . . . . .	95

---

5.3.2	DNA-Isolierung . . . . .	96
5.3.3	Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	96
5.3.4	Restriktionsverdau von DNA mittels Endonukleasen . . . . .	97
5.3.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten . . . . .	98
5.3.6	Verknüpfung von DNA-Fragmenten mittels Ligase . . . . .	98
5.3.7	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	98
5.3.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten . . . . .	99
5.3.9	Transformation . . . . .	99
5.3.10	Ortsgerichtete Mutagenese . . . . .	100
5.3.11	Der Expressionsvektor pET20b(+) . . . . .	100
5.3.12	Oligonukleotide . . . . .	100
5.4	Biochemische Arbeitsmethoden . . . . .	101
5.4.1	Herstellung ultrakompetenter Zellen . . . . .	101
5.4.2	Wachstumsmessungen . . . . .	102
5.4.3	Anlegen von Glycerinkulturen . . . . .	102
5.5	Expression und Isolierung von SecB . . . . .	103
5.5.1	Aufzucht und Lyse der Zellen . . . . .	103
5.5.2	Chromatographische Aufreinigung von SecB . . . . .	104
5.6	Expression und Isolierung von preMBP . . . . .	107
5.6.1	Expression von preMBP . . . . .	107
5.6.2	Chromatographische Aufreinigung von preMBP . . . . .	108
5.6.3	Entfernen der Maltose aus dem preMBP-Maltose-Komplex . . . . .	109
5.6.4	Fluoreszenzmessung von preMBP . . . . .	109
5.7	Expression und Isolierung von all-Ala-BPTI . . . . .	110
5.7.1	Aufzucht und Lyse der Zellen . . . . .	110
5.7.2	Isolierung aus den <i>Inclusion Bodies</i> . . . . .	110
5.7.3	Nickel-Affinitätschromatographie . . . . .	111
5.7.4	Lyophilisieren . . . . .	111
5.8	Chemische Modifizierungen . . . . .	112
5.8.1	Carboxyamidomethylierung von BPTI . . . . .	112
5.8.2	Fluoreszenzlabeling von BPTI mit Fluoresceinisothiocyanat . . . . .	113
5.9	<i>High Performance Liquid Chromatographie</i> . . . . .	113
5.10	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> . . . . .	114
5.10.1	Vorbereitung der unverdauten Proben . . . . .	114
5.10.2	Vorbereitung der Proben durch tryptischen Verdau . . . . .	114



---

5.11	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i> -Spektroskopie . . . . .	116
5.11.1	<i>Site-Directed Spinlabeling</i> mit MTS und IOPI . . . . .	116
5.11.2	<i>Continuous Wave</i> -EPR Messungen . . . . .	117
5.11.3	<i>Double Electron-Electron Resonance</i> -Messungen . . . . .	118
	<b>Literatur</b>	<b>119</b>
	<b>A Anhang</b>	<b>128</b>
A.1	MALDI-ToF Massenspektren des tryptischen Verdaus von SecB . . . . .	128
A.2	Plasmidkarten . . . . .	129
A.3	Sequenziererergebnisse . . . . .	131
	<b>B Danksagungen</b>	<b>136</b>
	<b>C Publikationen</b>	<b>138</b>
	<b>D Lebenslauf</b>	<b>139</b>

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Übersicht der Chaperonfamilien . . . . .	2
1.2	Schematisches Modell der Proteinfaltung . . . . .	4
1.3	Signalsequenz von Sec-abhängigen Präproteinen . . . . .	5
1.4	Bakterielle Möglichkeiten der Proteintranslokation . . . . .	9
1.5	Aufbau des SecYEG-Translokons . . . . .	11
1.6	Kristallstruktur von SecB aus <i>E. coli</i> . . . . .	13
1.7	SecB-Peptidbindungsstelle . . . . .	15
1.8	Hypothetischer SecA-SecB-Komplex . . . . .	15
1.9	Kristallstruktur von MBP in Komplex mit Maltose von <i>E. coli</i> . . . . .	17
1.10	Kristallstruktur von BPTI und Verknüpfung der Cysteine nach Kunitz . .	18
1.11	Zeeman-Aufspaltung und Absorptionslinie unter Resonanzbedingungen .	21
1.12	Hyperfeinaufspaltung eines EPR-Signals . . . . .	23
1.13	Temperaturabhängige Immobilisierung eines EPR-Spektrums . . . . .	24
1.14	Auswirkungen von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf EPR-Spektren . .	24
1.15	Larmor-Präzession von Elektronenspins in Richtung eines Magnetfeldes .	25
1.16	Magnetisierungsvektoren während eines Puls-EPR-Experiments . . . . .	26
1.17	Pulssequenz des DEER-Experiments . . . . .	27
3.1	Elutionsdiagramm der <i>fast-flow</i> Q-Sepharose-Säule mit SecB WT . . . . .	30
3.2	Elutionsfraktionen der <i>fast-flow</i> Q-Sepharose-Säule mit SecB WT . . . . .	31
3.3	Elutionsdiagramm der Sephacryl-S200 HR-Säule mit SecB WT . . . . .	31
3.4	Elutionsfraktionen der Sephacryl-S200 HR-Säule mit SecB WT . . . . .	32
3.5	Aufgereinigtes SecB WT-Protein . . . . .	32
3.6	Lage der Cysteine im SecB-Tetramer . . . . .	33
3.7	SecB <i>forward</i> -Primer . . . . .	35
3.8	SecB <i>reverse</i> -Primer . . . . .	35
3.9	Amplifizierung der SecB-Gene aus den Ursprungsvektoren . . . . .	36
3.10	Restriktionsverdau der pET20b(+)-SecB-Vektoren mit <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> . .	37
3.11	DNA-Sequenzvergleich der Mutante SecB C97 mit der SecB WT-Sequenz	40
3.12	Schematischer Ablauf der ortsgerichteten Mutagenese . . . . .	41
3.13	DNA-Sequenzvergleich von SecB ohne Cysteine mit SecB C97 . . . . .	42
3.14	Funktionsweise der Nickel-NTA-Affinitätschromatographie . . . . .	43
3.15	Elutionsfraktionen der Nickel-NTA-Agarose-Säule mit SecB . . . . .	45

3.16	Elutionsfraktionen der denaturierenden Nickel-NTA-Agarose-Säule . . .	45
3.17	Elutionsfraktionen der denaturierenden Nickel-NTA-Agarose-Säule . . .	46
3.18	Thrombinspaltung von SecB . . . . .	47
3.19	MALDI-ToF MS von SecB vor und nach Thrombinspaltung . . . . .	48
3.20	Elutionsdiagramm der Amylose-Säule mit preMBP A14E . . . . .	49
3.21	Elutionsfraktionen der Amylose-Säule mit preMBP A14E . . . . .	50
3.22	UV- und Fluoreszenzspektrum von preMBP mit Maltose . . . . .	51
3.23	Fluoreszenzspektrum von preMBP mit und ohne Maltose . . . . .	51
3.24	Mechanismus der Carboxyamidomethylierung . . . . .	52
3.25	MALDI-ToF MS von unmodifiziertem und cam-BPTI . . . . .	52
3.26	Fluoreszenzlabeling von cam-BPTI mit FITC . . . . .	54
3.27	MALDI-ToF MS von FITC-gelabeltem BPTI . . . . .	54
3.28	Wasch- und Elutionsfraktionen der Nickel-NTA-Säule mit all-Ala-BPTI .	56
3.29	Einfluss von GdnHCl auf die Konformation von preMBP . . . . .	59
3.30	Einfluss von GdnHCl auf die Konformation von SecB WT . . . . .	59
3.31	Einfluss von GdnHCl auf die Konformation von SecB E90C . . . . .	59
3.32	Hitzedenaturierung von SecB WT . . . . .	60
3.33	Rückfaltung von preMBP A14E in Gegenwart von GdnHCl . . . . .	60
3.34	Komplexbildung zwischen SecB WT und preMBP A14E . . . . .	61
3.35	Komplexbildung zwischen SecB E90C und preMBP A14E . . . . .	61
3.36	SecB WT-preMBP A14E-Komplex . . . . .	62
3.37	Komplexbildung zwischen SecB WT und preMBP A14E . . . . .	62
3.38	Absorptionsspektrum von cam-FITC-BPTI . . . . .	64
3.39	Fluoreszenzspektrum von cam-FITC-BPTI mit und ohne SecB . . . . .	64
3.40	<i>Molecular Modeling</i> von SecB SecB C97 und E90C. . . . .	65
3.41	Molekülstruktur von MTS . . . . .	66
3.42	Molekülstruktur von IOPI . . . . .	66
3.43	Mechanismus der $S_N2$ -Reaktion von MTS mit einer Thiolgruppe . . . . .	67
3.44	MALDI-ToF MS von MTS-gelabeltem SecB E90C . . . . .	68
3.45	MALDI-ToF MS von IOPI-gelabeltem SecB E90C . . . . .	68
3.46	RT-EPR-Spektrum von freiem MTS-Spinlabel . . . . .	70
3.47	RT-EPR-Spektrum von freiem IOPI-Spinlabel . . . . .	70
3.48	RT-EPR-Spektrum von SecB WT-MTS . . . . .	70
3.49	RT-EPR-Spektrum von SecB E90C-IOPI . . . . .	70
3.50	Raumtemperatur-EPR-Spektrum von SecB WT-IOPI mit BPTI . . . . .	71

3.51	Raumtemperatur-EPR-Spektrum von SecB E90C-IOPI mit BPTI . . . . .	71
3.52	RT-EPR-Spektrum von SecB WT-MTS mit preMBP . . . . .	72
3.53	RT-EPR-Spektrum von SecB E90C-IOPI mit preMBP . . . . .	72
3.54	RT-EPR-Spektrum von SecB WT-MTS mit preMBP-MTS . . . . .	72
3.55	RT-EPR-Spektrum von SecB E90C-IOPI mit preMBP-IOPI . . . . .	72
3.56	Schematisches Modell der Substratbindung an SecB. . . . .	74
3.57	RT-EPR-Spektrum von SecB C113-MTS . . . . .	74
3.58	TT-EPR-Spektrum von SecB WT-MTS . . . . .	76
3.59	TT-EPR-Spektrum von SecB WT-IOPI . . . . .	76
3.60	TT-EPR-Spektrum von SecB E90C-IOPI mit BPTI . . . . .	77
3.61	TT-EPR-Spektrum von SecB WT-MTS mit preMBP . . . . .	78
3.62	TT-EPR-Spektrum von SecB WT-IOPI mit preMBP . . . . .	78
3.63	TT-EPR-Spektrum von SecB E90C-IOPI mit preMBP-IOPI . . . . .	79
3.64	Abstandsverteilung der DEER-Messung von SecB WT mit BPTI . . . . .	80
3.65	Abstandsverteilung der DEER-Messung von SecB C97 mit BPTI . . . . .	80
3.66	Abstandsverteilung der DEER-Messung von SecB E90C mit BPTI . . . . .	82
3.67	Ausschnitt von SecB WT mit markierten Cysteinen . . . . .	82
A.1	MALDI-Analyse des tryptischen Verdaus von SecB WT . . . . .	128
A.2	MALDI-Analyse des tryptischen Verdaus von SecB E90C . . . . .	128
A.3	Plasmidkarte pET20b(+) . . . . .	129
A.4	Plasmidkarte pET20b(+) mit SecB . . . . .	130
A.5	Plasmidkarte pET20b(+) mit all-Ala-BPTI . . . . .	130
A.6	Sequenzierung SecB WT . . . . .	131
A.7	Sequenzierung SecB E90C . . . . .	132
A.8	Sequenzierung SecB Q14C . . . . .	133
A.9	Sequenzierung SecB Y109C . . . . .	134
A.10	Sequenzierung SecB A113C . . . . .	135

## Tabellenverzeichnis

3.1	Punktmutationen zur Erzeugung weiterer SecB-Mutanten . . . . .	39
3.3	Abstände zwischen den MTS-Spinlabel verschiedener SecB-Mutanten . . . . .	65
5.17	Synthetische Oligonukleotide . . . . .	101
5.38	Parameter der cw-EPR-Messungen im X-Band . . . . .	118

## Verwendete Abkürzungen

A	Ampicillin
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	<i>Absorption Units</i>
BCA	4,4-Dicarboxy-2,2-bichinolin-Natriumsalz
bp	Basenpaare
BPTI	<i>Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor</i>
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
cam	carboxyamidomethyliert
cw	<i>Continuous Wave</i>
Da	Dalton
DEER	<i>Double Electron Electron Resonance</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtBr	Ethidiumbromid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Gauss
GBP	<i>Galactose-Binding Protein</i>
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid

---

GHz	Gigahertz
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HPLC	Hochleistungs-/Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HSP	Hitzeschockprotein
IOPI	4-(3-Iod-2-oxopropyliden-1-)2,2,3,5,5-pentamethyl-imidazolin-1-oxyl
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
MALDI-ToF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight</i>
m	Masse
mAU	<i>Milliabsorption Units</i>
MBP	<i>Maltose-Binding Protein</i>
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
ms	Millisekunde
MTS	1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- $\Delta^3$ -pyrrolidin-3-methylthiosulfonat
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
Omp	<i>Outer Membrane Protein</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PELDOR	<i>Pulsed Electron Double Resonance</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

---

preMBP	<i>Precursor Maltose-Binding Protein</i>
r	Radius
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions Per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	Sinapinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SL	Spinlabel
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i>
T	Tesla
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TT	Tieftemperatur
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vis	sichtbar
WT	Wildtyp
Z	Ladungsverhältnis

Die Aminosäureabkürzungen entsprechen der Drei- bzw. Einbuchstabennomenklatur.

# 1 Einleitung

Der Aufbau einer Bakterienzelle wie *Escherichia coli* erscheint, verglichen mit dem Aufbau eukaryotischer Zellen, sehr einfach. Jedoch enthalten auch Bakterienzellen unterschiedliche Kompartimente: Im Zellinnern befindet sich das Cytoplasma, welches von der Cytoplasmamembran umgeben ist. Hierauf folgt der periplasmatische Raum, auch Periplasma genannt, der von der äußeren Membran umschlossen wird. Die an den Ribosomen im Cytoplasma synthetisierten Polypeptide müssen an ihren spezifischen Wirkort – teilweise auch über die Cytoplasmamembran – gelangen, um letztlich dort ihre Aufgabe zu erfüllen (Fekkes und Driessen, 1999). Hierbei helfen unter anderem die Chaperone.

## 1.1 Chaperone

In den vergangenen Jahren wurde die Rolle der molekularen Chaperone (von franz. „Anstandsdame“) bei der Proteinfaltung zunehmend erforscht und aufgeklärt (Zhou und Xu, 2005). Es handelt sich um eine evolutionär hochkonservierte Klasse von Proteinen, die die Aggregation von naszierenden und neu synthetisierten Polypeptiden verhindern und fehlgefalteten oder kürzlich denaturierten Polypeptiden helfen, sich in ihre aktive Konformation zu falten (Xu *et al.*, 2000; Panse *et al.*, 2001). Sie regulieren physiologische Prozesse und können Proteine bei Wärmeeinwirkung stabilisieren. Stressbedingungen, wie beispielsweise ein Hitzeschock, induzieren die Synthese von Chaperonen, weshalb man sie auch als **Hitzeschockproteine** (Hsp) bezeichnet (Mogk *et al.*, 2001). Sie interagieren mit einer Vielzahl verschiedener Polypeptide, ohne Bevorzugung bestimmter Sequenzmotive. Mit nativ gefalteten Polypeptiden sowie sehr kleinen Proteinen tritt keine Interaktion auf (Hartl, 1996). Chaperone finden sich sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten.

Der Wirkmechanismus eines Chaperons lässt sich in drei Teilschritte gliedern: die Erkennung und Bindung von nicht-nativen Polypeptiden, die Konformationsbearbeitung (oftmals unterstützt durch Co-Chaperone und ATP-Hydrolyse) sowie das Freisetzen des bearbeiteten Polypeptids (Buchner, 2002).

Nach ihrer evolutionären Konservierung erfolgt die Einteilung in bestimmte Familien, deren Namen sich jeweils vom Molekulargewicht der Hauptvertreter ableiten. Die folgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über einige pro- und eukaryotische Chaperone sowie deren Funktion (vgl. Abb. 1.1 auf Seite 2).











Chaperon-familie	Struktur	ATP	Vertreter prok. euk.	Co-Chaperon	Funktion
Hsp100	6-7-mer 	+	ClpB		- Disaggregation zusammen mit Hsp70
			ClpA		- Proteolyse zusammen mit der Protease ClpP
			Hsp104		- Thermoresistenz - Disaggregation zusammen mit Hsp70
Hsp90	Dimer 	+	HtpG		- Resistenz gegen extremen Hitzeschock
			Hsp90	Hop, p23, CDC37	- Stressresistenz, Kontrolle der Faltung und Aktivität von Steroidrezeptoren, Proteinkinasen u. a.
Hsp70	Monomer 	+	DnaK	DnaJ, GrpE	- De-novo-Proteinfaltung - Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen - Auflösung von Proteinaggregaten zusammen mit ClpB - Regulation der Hitzeschockantwort
			Hsp70	Hsp40	- De-novo-Proteinfaltung
			Hsc70	Bag1 Hip Chip	- Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen - Auflösung von Proteinaggregaten zusammen mit Hsp104 - Regulation der Hitzeschockantwort
				Hop HspBP1	- Regulation der Aktivität gefalteter Regulatorproteine (z. B. Transkriptionsfaktoren und Kinasen)
Hsp60	14-mer 	+	GroEL	GroES	- De-novo-Proteinfaltung - Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen
				CCT/TRIC	Prefoldin
sHsp	8-24-mer 		IbpA		- Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen
			IbpB		- Bindung an Inclusion Bodies
			Hsp25 Crystallin		- Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen - Bestandteil der Linse des Wirbeltierauges
Trigger-Faktor	Monomer 		Trigger-Faktor	-	- Ribosomen-assoziiertes Chaperon mit Funktion in der De-novo-Proteinfaltung
NAC	Heterodimer 			NAC	- Ribosomen-assoziiertes Chaperon mit potentieller Funktion in der De-novo-Proteinfaltung
SecB	Tetramer 		SecB		- Sekretion von Proteinen

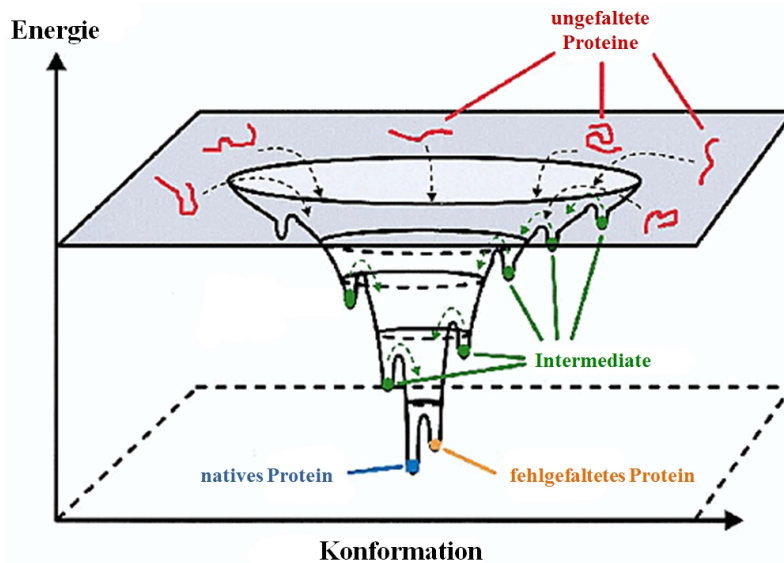
Abb. 1.1: Struktur und Funktion pro- und eukaryotischer Chaperonfamilien (Mogk *et al.*, 2001).

Um ihre physiologische Funktion in der Zelle zu erfüllen, müssen Proteine ihre korrekte räumliche Struktur einnehmen. Die Aminosäuresequenz (Primärstruktur) eines Proteins gibt die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur eines Proteins vor (Anfinsen, 1973). Das Levinthal'sche Paradoxon spiegelt die Notwendigkeit, dass dieser Faltungsprozess naszierender Polypeptide unterstützt werden muss. Die Anzahl der möglichen Faltungen  $x$  steigt exponentiell mit der Anzahl der Aminosäuren  $n$  an. Cyrus Levinthal ging von der Annahme aus, dass jede Aminosäure eines Proteins drei mögliche Konformationen einnehmen kann. Bei einem kleinen Protein mit 100 Aminosäuren ergäbe dies eine Gesamtzahl an möglichen Faltungen von  $x^n = 3^{100} \approx 5 \cdot 10^{47}$ . Weiterhin machte Levinthal die Annahme, dass es nur  $10^{-13}$  Sekunden dauert, um von einer Konformation zur nächsten zu gelangen. Somit wären bis zu  $5 \cdot 10^{47} \cdot 10^{-13}$  Sekunden, d.h. umgerechnet  $1,65 \cdot 10^{27}$  Jahre notwendig, bis das Protein in seine energetisch günstigste Konformation gefaltet wäre (Levinthal, 1968). Zum Vergleich: Das Alter der Erde liegt bei ca.  $4,55 \cdot 10^9$  Jahren und die beobachteten Faltungszeiten von Proteinen in der Zelle liegen im Millisekunden- bis Sekundenbereich.

Der Aminoterminus eines neu synthetisierten Polypeptids verlässt das Ribosom einige Sekunden bis Minuten früher als der Carboxyterminus. Bedingt durch die hohe Proteinkonzentration im Cytosol hat das Protein genügend Reaktionspartner und ausreichend Zeit für schädliche Interaktionen (Stryer, 1996). Vor allem der Faltungsprozess größerer Proteine, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, ist sehr störanfällig. Während der Faltung kann es zu inkorrekten Wechselwirkungen bestimmter Abschnitte kommen, was die Entstehung von aggregationsgefährdeten Faltungsintermediaten zur Folge hat. Diese verfügen häufig über exponierte hydrophobe Aminosäuren (sog. „klebrige Stellen“), die das Aggregieren des Intermediats verursachen (Mogk *et al.*, 2001). Weiterhin können Proteine mit falscher Disulfidverbrückung ebenfalls aggregationsgefährdet sein. Aus den dargelegten Gründen ist es erforderlich, den co- und post-translationalen Faltungsprozess durch Chaperone zu unterstützen und zu kontrollieren.

Lange Zeit galt die Annahme, dass es einen spezifischen Faltungsweg gibt, den jedes Protein durchlaufen muss, um seine native Konformation zu erreichen. Jedoch kann ein Protein von so vielen verschiedenen entfalteten Zuständen seine aktive Struktur erreichen, dass aktuelle Modelle den Faltungsmechanismus mit „Faltungstrichtern“ und „Energie-landschaften“ vergleichen. Die native Konformation nimmt den thermodynamisch günstigsten Zustand mit der niedrigsten Energie ein. Alle nicht nativen Strukturen besitzen eine höhere Energie. Der „Faltungstrichter“ (siehe Abb. 1.2 auf Seite 4) repräsentiert viele verschiedene Faltungswege, die je nach Gestalt schnell oder langsam den energieärmsten Punkt, die native Konformation, erreichen (Mogk *et al.*, 2001).

Der „Faltungstrichter“ zeigt die freie Energie aller möglichen Proteinkonformationen in Abhängigkeit der Bewegungsfreiheitsgrade. Hierbei existieren mehrere lokale Energieminima. Diese stellen Zwischenstufen dar, die das Protein während seiner Faltung in den energieärmsten Zustand einnehmen kann. Zum Teil repräsentieren diese lokalen „Intermediate“ schon sehr stabile und kompakte Strukturen, sog. „*Molten Globules*“, wohingegen andere Energieminima eine Sackgasse darstellen und die Proteine in einem fehlgefalteten Zustand halten, aus dem sie sich alleine durch die Brown'sche Molekularbewegung nicht mehr befreien können (Mogk *et al.*, 2001). Damit ein fehlgefaltetes Protein wieder in seine native Konformation gelangen kann, sind Chaperone notwendig, welche die zur Umfaltung notwendige Energie liefern (Mogk *et al.*, 2001).



**Abb. 1.2:** Schematisches Modell des Proteinfaltungsmechanismus. Der „Faltungstrichter“ repräsentiert verschiedene Faltungswege, die über mehrere Intermediate schließlich zum energieärmsten Punkt, der nativen Konformation, führen (Schultz, 2000).

Weiterhin spielen Chaperone eine wichtige Rolle bei der Proteintranslokation über die Cytoplasmamembran, da eine Vielzahl von (*Precursor*)-Proteinen (Vorläuferproteinen) als ungefaltete Polypeptide zunächst in einem entfalteten oder teilentfalteten, translokationskompetenten Zustand gehalten werden müssen, bis sie an ihrem Zielort ankommen (Zhou und Xu, 2005). Das Chaperon SecB erfüllt in *E. coli* eine solche Aufgabe, die im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird.

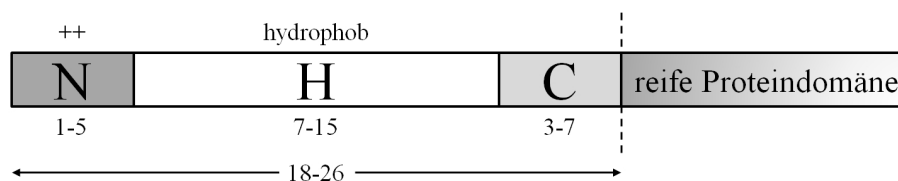
## 1.2 Proteintransport in *Escherichia coli*

Bis zur Hälfte aller im Cytoplasma synthetisierten Proteine müssen die innere Cytoplasmamembran überwinden, um an ihren endgültigen Bestimmungsort, den periplasmatischen Raum bzw. die äußere Bakterienmembran, zu gelangen (Kim und Kendall, 2000; Krishnan, 2004). Hierzu stehen in Bakterien zwei Haupttransportwege zur Verfügung: das Tat-System (*Twin-Arginine Translocation*), welches schon gefaltete und an Cofaktoren gebundene Proteine transportiert sowie das Sec-System (*Secretory*), welches im Wesentlichen für den Export neu synthetisierter Proteine aus dem Cytoplasma verantwortlich ist (Mori und Ito, 2001). Die zu sezernierenden Polypeptide besitzen spezielle Signalsequenzen, mit deren Hilfe die Wechselwirkung mit dem jeweiligen Transporter erfolgt.

### 1.2.1 Signalsequenz

Viele für den Proteintransport in den periplasmatischen Raum oder an die äußere Bakterienmembran bestimmte Proteine werden als Vorläuferproteine (Präproteine) im Cytoplasma synthetisiert. Sie sind mit einer speziellen, meist aminoterminalen, 18 bis 30 Aminosäuren langen Signalsequenz ausgestattet, an der das Chaperon das Vorläuferprotein erkennt. Verschiedene Signalsequenzen unterschiedlicher Vorläuferproteine weisen keinerlei Sequenzhomologien auf, bestehen jedoch alle aus drei Domänen: dem positiv geladenen Aminoterminus (N-Region), der nichtpolaren, hydrophoben Kernregion (H-Region) sowie der polaren Spaltungsregion (C-Region) (Blobel und Dobberstein, 1975). Signalsequenzen verlangsamen allgemein den Faltungsprozess eines naszierenden Polypeptids und ermöglichen Chaperonen somit die Bindung. Weiterhin bestimmt die Signalsequenz den jeweiligen Transportweg des Polypeptids.

Die positiv geladene, aminoterminal gelegene N-Region ist an der Zielsteuerung der Vorläuferproteine zum Translokationskomplex beteiligt und erhöht die Translokationsrate (de Vrije *et al.*, 1990). Außerdem bindet dieser Abschnitt an die negativ geladene Membranoberfläche der Lipiddoppelschicht. Die H-Region variiert in ihrer Länge von 7 bis 15 Aminosäuren und ist der wichtigste Teil der Signalsequenz. Die Hydrophobizität der H-Domäne bestimmt die Effizienz der Translokation. Je größer die Hydrophobizität, desto effizienter die Translokation. Die polare C-Domäne trägt die Spaltstelle zur Abspaltung der Signalsequenz durch die membrangebundene Signalpeptidase vom reifen Protein (Fekkes und Driessen, 1999). In Abbildung 1.3 sind diese Domänen am Beispiel der Signalsequenz eines Sec-System-abhängigen Vorläuferproteins dargestellt.



**Abb. 1.3:** Struktur der Signalsequenz eines Sec-abhängigen Präproteins: aminoterminal N-Domäne mit positiver Netto-Ladung, hydrophobe H-Domäne und C-Domäne mit *Cleavage Site* als Schnittstelle zwischen Signalsequenz und reifer Proteindomäne. Die Zahlen geben jeweils die Länge in Aminosäuren an (Abb. nach Fekkes und Driessen, 1999).

### 1.2.2 Tat-abhängiger Proteintransport

Über den Tat-vermittelten Transportweg (*Twin-Arginine Translocation System*) werden bereits vollständig gefaltete Proteine über die Cytoplasmamembran von Bakterien und Archaeobakterien transportiert oder auch über die Thylakoidmembran von Chloroplasten bei Pflanzen. Er verdankt seinen Namen zwei Argininen innerhalb der N-Domäne der Signalsequenz (Fröbel *et al.*, 2012). Das Translocon besteht insgesamt aus drei integralen Membranproteinen TatA, TatB und TatC. TatA und TatB sind homologe Proteine mit jeweils einer transmembranen und einer amphipatischen Helix, TatC besteht aus sechs membrandurchspannenden Helices. TatB und TatC bilden zusammen den Rezeptorkomplex, an den das Substrat bindet. Erst nach erfolgter Substratbindung lagert sich TatA an den Komplex an. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von TatA gaben Aufschluss darüber, dass TatA in Form von Homooligomeren unterschiedlicher Anzahl eine für das Substratmolekül passgenaue Pore durch die Cytoplasmamembran bildet. Es gibt Hinweise darauf, dass das Tat-Translokon nicht als vorgefertigte Pore in der Membran vorkommt, sondern sich erst in Abhängigkeit von seinem jeweiligen Substrat zusammenlagert (Fürst und Müller, 2010). Hierbei ist der Transport von gefalteten Proteinen oder zusammengelegerten Proteinkomplexen bis zu einem Durchmesser von 70 Ångström möglich (Sala *et al.*, 2014). Dieser Transportweg ist im rechten Teil der Abbildung 1.4 auf Seite 9 dargestellt.

### 1.2.3 Sec-abhängiger Proteintransport

Im Gegensatz zum Tat-abhängigen Transportweg, über den der Export vollständig gefalteter Proteine erfolgt, werden über den Sec-abhängigen Transportweg Polypeptide im entfaltenen Zustand durch die Cytoplasmamembran transportiert oder in diese integriert. Das Sec-Translokon umfasst im Cytoplasma bewegliche Zielsteuerungsfaktoren, die das Substrat an die Membran geleiten, den in die Membran integrierten Transportkanal sowie zahlreiche assoziierte Membrankomponenten und Faktoren, welche der Energiebereitstellung dienen (Fürst und Müller, 2010). In prokaryotischen Zellen existieren zur Translokation von sekretorischen oder integralen Proteinen zwei parallele Mechanismen: das SRP (*Signal Recognition Particle*)-abhängige und das SecB-abhängige *Targeting* (Fekkes und Driessen, 1999). Beide Transportwege nutzen das transmembrane SecYEG-Translokon, welches eine Pore in der Membran bildet. Des Weiteren besitzt jeder Transportweg im

Cytoplasma bewegliche Faktoren, entweder SRP oder SecB. Beide Transportwege sind energieabhängig. Die SRP-abhängige Zielsteuerung nutzt GTP als Energielieferant, die SecB-abhängige Variante ATP (Fürst und Müller, 2010).

Sobald die Signalsequenz des translatierten Proteins das Ribosom verlässt, konkurrieren das SRP und der zum SecB-abhängigen Transportweg gehörende Trigger Factor um die Bindung an die naszierende Polypeptidkette (Lycklama a Nijeholt und Driessen, 2012). Hierbei steigt das Ausmaß der Wechselwirkung des SRPs mit zunehmender Hydrophobizität der H-Region der jeweiligen Signalsequenz (Driessen und Nouwen, 2008).

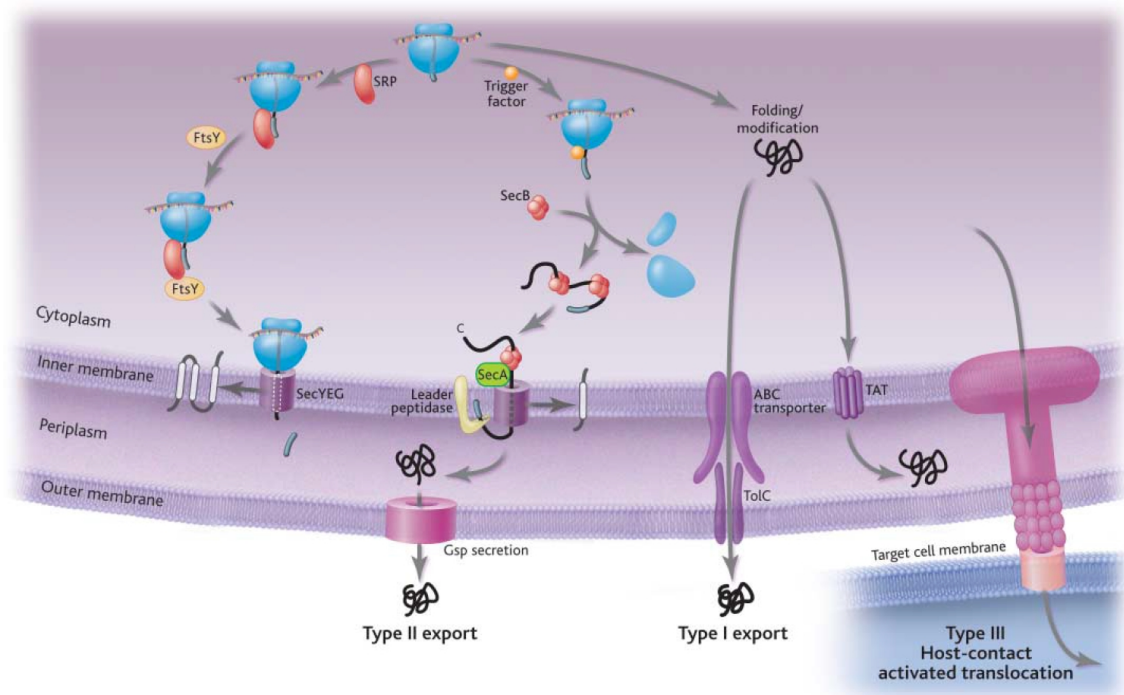
#### 1.2.3.1 SRP-ABHÄNGIGES PROTEIN-Targeting

Der SRP-abhängige Proteintransport existiert sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten. Entdeckt wurde das *Signal Recognition Particle* (SRP) zuerst in Säugetiergewebe und ist dort an der Zielsteuerung naszierender Polypeptide in das Endoplasmatische Reticulum beteiligt (Corsi und Schekman, 1996; Rapoport *et al.*, 1996). In Bakterien wie *E. coli* ist das SRP für den Transport integraler Membranproteine verantwortlich. Diese werden co-translational vom SRP bereits am Ribosom gebunden, wodurch eine Aggregation der hydrophoben Membranproteine im wässrigen Milieu des Cytoplasmas verhindert wird. Hierbei erkennt und bindet das SRP hydrophobe Sequenzen innerhalb der Signalsequenz des Membranproteins noch während der Translation (Fürst und Müller, 2010). In Folge dessen wird die weitere Translation kurzzeitig unterbrochen und es kommt zur Wechselwirkung des gesamten Komplexes mit dem SRP-Rezeptor FtsY, der sowohl cytosolisch als auch membranassoziiert vorliegen kann (Luirink und Dobberstein, 1994; Fekkes und Driessen, 1999). SRP und FtsY sind beides GTPasen, die sich durch Dimerisierung gegenseitig aktivieren und zwei gemeinsame GTP-Bindungsstellen bilden. Der gesamte Komplex tritt schließlich über die große ribosomale Untereinheit mit dem SecYEG-Translokon in Kontakt. Nach dieser Bindung wird das gebundene GTP hydrolysiert, SRP und FtsY lösen sich voneinander und die Translation des naszierenden Polypeptids wird fortgesetzt (Fürst und Müller, 2010). Hierbei wird die wachsende Peptidkette über den SecYEG-Membrankanal in die Cytoplasmamembran integriert (Chen und Tai, 1987) (vgl. linker Teil des Zyklus in Abb. 1.4 auf Seite 9).

### 1.2.3.2 SEC B-ABHÄNGIGES PROTEIN-Targeting

In Bakterien wie *E. coli* und anderen Gram-negativen Bakterien werden sekretorische Proteine überwiegend post-translational in den periplasmatischen Raum exportiert (siehe rechter Teil des Zyklus in Abb. 1.4 auf Seite 9). Zunächst hält das cytoplasmatische Chaperon Trigger Factor, welches an die Signalsequenz der wachsenden Polypeptidkette gebunden ist, das Protein in einem entfaltenen Zustand (Driessen und Nouwen, 2008). Nach erfolgter Translation und Freisetzung vom Ribosom wird das zu translozierende Protein vom cytosolischen, tetrameren Chaperon SecB gebunden. Dieses hält es während des Transports an das Translokons zur Cytoplasmamembran in einem entfaltenen, translokationskompetenten Zustand (Fürst und Müller, 2010). Hierbei erfolgt die Bindung des Chaperons an das Substrat nicht – wie beim Tat- oder SRP-abhängigen Proteintransport – an eine Signalsequenz, sondern an die reife Proteindomäne (Kim und Kendall, 2000). An der Cytoplasmamembran angekommen, erkennt die membrangebundene ATPase SecA das Chaperon sowie die Signalsequenz und das Vorläuferprotein wird an die ATPase übergeben. SecB verlässt den Komplex und steht für einen erneuten Transportzyklus bereit (Fekkes *et al.*, 1998).

Stöchiometrisch betrachtet wechselwirken insgesamt vier SecB-Moleküle mit zwei SecA-ATPasen und einem Substrat (Driessen, 2001). SecA stellt anschließend den Kontakt zwischen Vorläuferprotein und SecY, einem Teil des Translokons, bestehend aus SecY, SecE und SecG her. Durch die Bindung und Hydrolyse von ATP an SecA wird die Übertragung des Signalpeptids auf SecY initiiert und somit das gesamte SecYEG-Translokons aktiviert. Nach erfolgter Translokation durch den SecYEG-Kanal wird die Signalsequenz von der Signalpeptidase abgespalten. Es erfolgt entweder der Einbau in die Lipiddoppelschicht oder – der häufigere Fall – die Freisetzung in den periplasmatischen Raum. Dort tritt das translozierte Protein beispielsweise mit dem periplasmatischen Chaperon PpiD in Kontakt, welches es zu seinem endgültigen Bestimmungsort geleitet (Antonova *et al.*, 2008; Kadokura und Beckwith, 2009).



**Abb. 1.4:** Verschiedene Möglichkeiten der Proteintranslokation in Bakterien (Wickner und Schekman, 2005). Dargestellt sind das SRP- sowie das Sec-abhängige Protein-Targeting. Zusätzlich zeigt die Abbildung den Tat-Export sowie die ABC-Transporter.

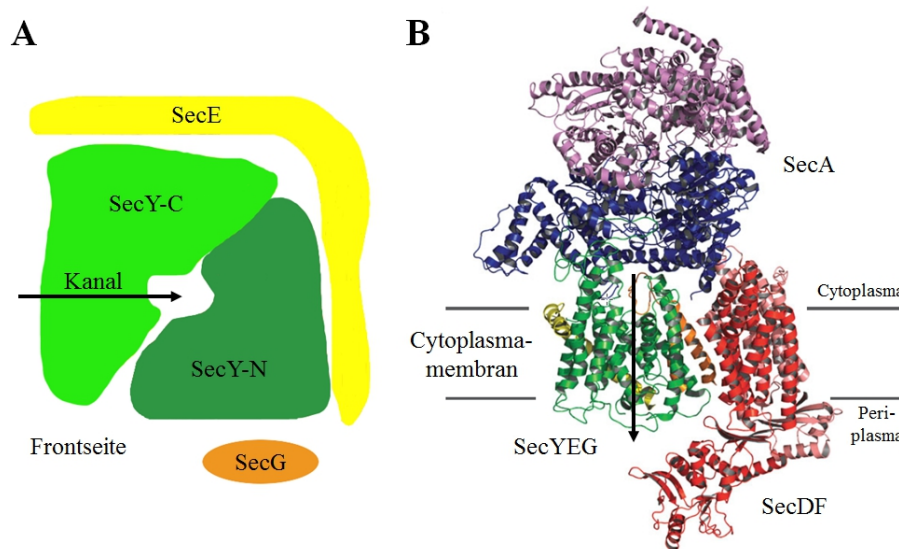
### 1.2.3.3 DAS *E. coli*-SEC-TRANSLOKON

Der Proteintransport über die Cytoplasmamembran von Prokaryoten ist ein entscheidender Schritt bei der Synthese von vielen sekretorischen Proteinen. Der Transport erfolgt durch einen hydrophilen Kanal, der Teil der Proteintranslokationsmaschinerie ist. Durch diesen Tunnel werden nicht nur sekretorische Proteine transportiert, er ermöglicht auch den Einbau von Proteinen in die Lipiddoppelschicht. Um diese Aufgaben zu bewerkstelligen, muss die Translokationsmaschinerie mehrere Anforderungen erfüllen: das Erkennen der Signalsequenz des Substrats, das Öffnen des Kanals, den Transport durch den Kanal sowie das Schließen des Kanals und dies alles, ohne für andere Moleküle permeabel zu sein (Matlack *et al.*, 1998). Im Falle von Membranproteinen müssen einige Proteinabschnitte in die Membran transportiert werden, wohingegen andere Abschnitte im Cytoplasma verbleiben. Diese hydrophoben Segmente, die in der Membran verbleiben, müssen erkannt werden, korrekt ausgerichtet und im Kanal in die Lipiddoppelschicht entlassen werden. Ein Vorgang, der für ein einziges Membranprotein mehrfach wiederholt werden muss.



Die Translokationsmaschinerie von *E. coli* ist einer der am besten untersuchten Proteinkomplexe. Der Translokasekomplex, auch als Translokon bezeichnet, besteht aus drei integralen Membranproteinen, SecY, SecE und SecG, die als Trimer in der Membran sitzen und den Translokationskanal bilden (Wickner und Leonard, 1996) sowie den cytosolischen Proteinen SecA und SecB. Weiterhin gibt es zwei Membranproteine, SecD und SecF, die nicht essentiell für die Proteintranslokation direkt sind, jedoch SecA in seiner aktiven Konformation stabilisieren und die Translokation unterstützen. SecA besitzt eine ATPase-Aktivität und stellt durch wiederholte Bindung und Hydrolyse von ATP die notwendige Energie für die Präprotein-Translokation zur Verfügung. Sobald SecA an den SecYEG-Komplex gebunden hat, erkennt es mit hoher Affinität das Chaperon SecB, die Signalsequenz sowie die reife Region der Präproteine (Fekkes und Driessen, 1999). Das oligomere Sec-Translokon bei Prokaryoten ist evolutionär konserviert und besitzt ein eukaryotisches Analogon im Endoplasmatischen Reticulum unter dem Namen Sec61 (Sijbrandi *et al.*, 2003). Das eukaryotische Sec12 erfüllt hierbei eine ähnliche Rolle wie SecA in Prokaryoten, außer dass es anstelle von ATP GTP als Energiequelle nutzt und Sec24 ist vergleichbar mit dem prokaryotischen SecB (Yan und Wu, 2015).

Der SecYEG-Kanal bildet einen Doppeltrichter durch die Membran, der zum Periplasma sowie zum Cytoplasma geöffnet ist und im Zentrum eine Verengung von fünf bis acht Ångström besitzt (siehe Abb. 1.5 auf Seite 11) (van den Berg *et al.*, 2004; Fürst und Müller, 2010). Den eigentlichen Kanal bildet das 49 kDa schwere SecY mit seinen zehn transmembranen Helices, die in zwei Gruppen mit je fünf Helices um die zentrale Öffnung herum angeordnet sind und von SecE zusammengehalten werden (Fürst und Müller, 2010). Das 14 kDa schwere SecE besteht seinerseits wiederum aus drei Transmembrandomänen (Schatz *et al.*, 1989). Durch die beiden einzelnen Hälften kann der Kanal seitwärts zur Lipiddoppelschicht hin geöffnet werden und somit den Austritt von Membranproteinen ermöglichen. SecG ist für die Proteintranslokation nicht essentiell, erhöht jedoch die Translokationseffizienz (Yan und Wu, 2015).



**Abb. 1.5:** Schematischer Aufbau des SecYEG-Translokons. **A** zeigt einen Querschnitt durch den SecYEG-Komplex vom Cytoplasma aus gesehen. SecY-N stellt die N-terminale Hälfte von SecY dar und umfasst die Helices eins bis fünf, SecY-C entsprechend die C-terminale Hälfte mit den Helices sechs bis zehn. Sekretorische Proteine durchqueren den von SecY gebildeten Kanal komplett ins Periplasma, während Membranproteine den Kanal auf der Frontseite in die Lipiddoppelschicht verlassen können. Abb. nach Fürst *et al.*, 2010. **B** zeigt im Bändermodell eine Seitenansicht des Komplexes bestehend aus SecYEG und SecDF in Wechselwirkung mit SecA. Der Translokationskanal ist mit einem Pfeil markiert (Lycklama a Nijeholt und Driessen, 2012).

Von periplasmatischer Seite her wird der Kanal in Abwesenheit eines Substrates durch eine kurze  $\alpha$ -Helix von SecY wie durch einen Stopfen, der bei Substrateintritt nach außen verlagert werden kann, verschlossen. Mit dem SecYEG-Translokon sind noch weitere Proteine (SecD, SecF und YajC) assoziiert, deren Funktion noch weitgehend unklar ist. Des Weiteren wechselwirkt das Sec-Translokon mit dem integralen Membranprotein YidC, welches als Chaperon beim Einbau von Membranproteinen eine Rolle spielt (Fürst und Müller, 2010).

Der Translokationskanal ist ein passiver Kanal, der seine Energie für den Proteintransport von der ATPase SecA erhält. SecA ist ein 102 kDa schweres, dimeres Protein, welches ATP an einer Domäne bindet und über weitere Domänen den Kontakt zwischen Substrat und dem Proteinkanal SecY herstellt. Durch wiederholte Bindung und Hydrolyse von ATP liefert SecA die zur Proteintranslokation notwendige Energie (Schiebel *et al.*, 1991; Fürst und Müller, 2010). Hierbei erfährt SecA eine Konformationsänderung, die durch wiederholtes Umfassen und Lösen des Vorläuferproteins zu einer Translokation des Polypeptids durch den Exportkanal von SecY führt (Fürst und Müller, 2010).

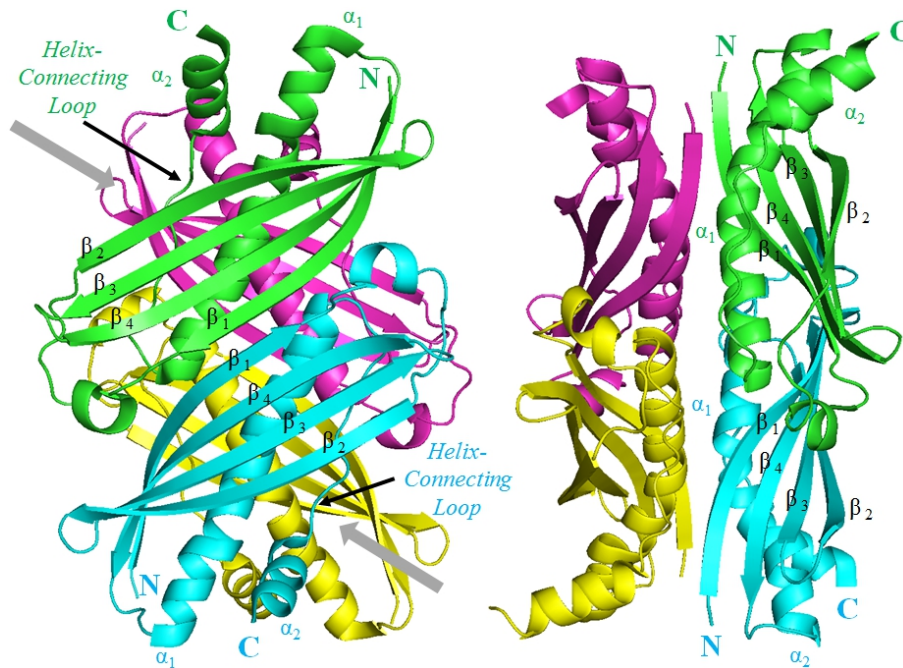
### 1.3 Das Chaperon SecB

SecB ist ein cytosolisches Chaperon, welches in *E. coli* und anderen Gram-negativen Bakterien vorkommt und an der post-translationalen Translokation von sekretorischen Proteinen über die Cytoplasmamembran beteiligt ist (Driessen, 2001; Zhou und Xu, 2005). *In vivo* besteht seine Aufgabe in der post-translationalen Erkennung und Bindung von Polypeptiden. Dabei wechselwirkt SecB nicht mit der Signalsequenz, sondern bindet an die reife Proteindomäne und hält das Polypeptid in einem entfalteten, translokationskompetenten Zustand (Randall *et al.*, 1997). Zu seinen natürlichen Substraten zählen beispielsweise MBP (*Maltose-Binding Protein*) (vgl. Kap. 1.4 auf Seite 16), GBP (*Galactose-Binding Protein*), OmpA und OmpF (*Outer Membrane Protein*) und das Maltoporin LamB (Lecker *et al.*, 1990; Topping und Randall, 1994; Khisty *et al.*, 1995). *E. coli*-Zellen mit einer Mutation im *secB*-Gen zeigen eine verminderte Transportaktivität für diese Substrate und ein gehemmtes Wachstum auf Nährmedien (Sala *et al.*, 2014). *In vitro* wechselwirkt das Chaperon SecB mit einer Anzahl nativ vorliegender Substrate wie zum Beispiel dem in Kap. 1.5 auf Seite 17 vorgestellten BPTI (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*) oder der Ribonuklease A (Diamond *et al.*, 1995; Fekkes *et al.*, 1995; Randall und Hardy, 2002).

#### 1.3.1 Die Struktur von SecB

Die SecB-Kristallstrukturen von *H. influenzae* (Xu *et al.*, 2000) und *E. coli* (Dekker *et al.*, 2003) zeigen, dass das Chaperon ein Tetramer ist, welches aus zwei identischen Dimeren besteht (Sala *et al.*, 2014). Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 68,8 kDa. Jedes der vier Monomere (A – D) besteht aus 155 Aminosäuren und liegt als viersträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt (Aminosäuren 15 – 96) vor mit einem Paar antiparalleler  $\alpha$ -Helices. Die beiden Monomere, die zusammen das Dimer bilden, sind um 180° gegeneinander gedreht, so dass der  $\beta$ 1-Strang der Untereinheit A antiparallel liegt zum  $\beta$ 1-Strang von Untereinheit B. Somit besteht das Dimer auf der Oberfläche insgesamt aus acht nebeneinanderliegenden  $\beta$ -Faltblättern und die  $\alpha$ -Helices sind jeweils ins Innere des Tetramers gerichtet (vgl. Abb. 1.6 auf Seite 13). Das Dimer wird hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden antiparallelen  $\beta$ 1-Faltblättern der benachbarten Monomere stabilisiert. Zusätzliche Wasserstoffbrücken existieren zwischen den Seitenketten der beiden  $\alpha$ 1-Helices sowie zwischen der  $\alpha$ 1-Helix einer Untereinheit und dem  $\beta$ 1-Faltblatt der zweiten Untereinheit. Die Tetramerstruktur wird einerseits durch

direkte Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Dimeren sowie über Wasserstoffbrücken zwischen Wassermolekülen stabilisiert, die sich zwischen den Dimeren befinden (Dekker *et al.*, 2003).



**Abb. 1.6:** Bändermodell des SecB-Tetramers in verschiedenen Blickwinkeln. Jede der vier Untereinheiten A bis D ist farblich gekennzeichnet. Weiterhin sind die C- bzw. N-Termini von zwei Untereinheiten sowie die jeweiligen  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter gekennzeichnet. Mit grau angedeutet sind die von Xu (Xu *et al.*, 2000) postulierten Peptidbindungskanäle. Abb. nach Zhou und Xu, 2005 unter Verwendung der Kristallstruktur von *E. coli*-SecB [PDB-Code: 1QYN, RCSB PDB (Dekker *et al.*, 2003)].

### 1.3.2 Wechselwirkungen von SecB

Der Proteinexport über den Sec-abhängigen Translokationsweg erfordert die Voraussetzung, dass das cytosolische Chaperon SecB einerseits sein zu exportierendes Substrat erkennt und bindet und zum zweiten, dass dieser Komplex über SecB in Wechselwirkung mit SecA treten kann.

Die Peptidbindungsstelle von SecB muss drei Kriterien erfüllen: Sie muss auf der Oberfläche von SecB lokalisiert sein, einen hydrophoben Charakter aufweisen und flexibel sein, um ein so großes Spektrum an unterschiedlichen Substraten binden zu können. Auf Basis der im Jahr 2000 veröffentlichten SecB-Kristallstruktur von *H. influenzae* beschreibt Xu *et al.* einen Bereich auf der Oberfläche von SecB, der all diese drei Krite-

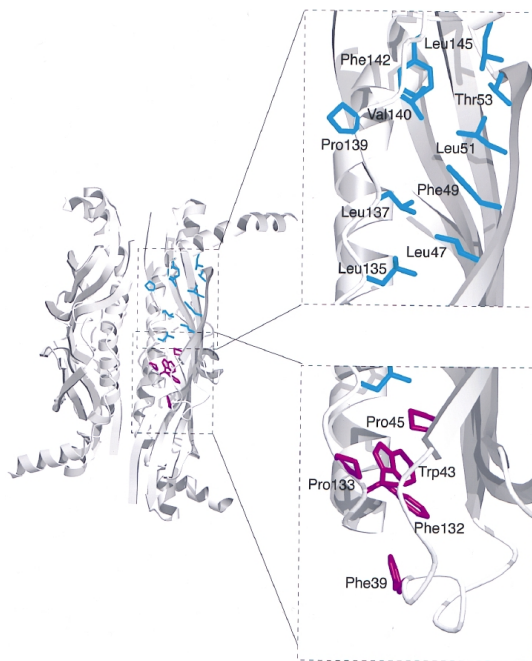
rien erfüllt. Es existiert eine Spalte zwischen der  $\alpha 2$ -Helix, dem  $\beta 2$ -Faltblatt sowie der Helix-verbindenden Schleife (*Helix-Connecting Loop*). Das Tetramer besitzt insgesamt vier solcher Spalten, zwei auf jeder Seite des Moleküls (vgl. Abb. 1.6 auf Seite 13). Die beiden Spalten eines Dimers bilden zusammen eine ca. 70 Ångström lange Furche, den von Xu *et al.* postulierten Peptidbindungskanal, so dass am Tetramer zwei solcher Bindungskanäle vorhanden sind. Viele Aminosäuren, die ins Innere des Bindungskanals zeigen, sind konserviert und weisen einen hydrophoben Charakter auf (vgl. Abb. 1.7 auf Seite 15) (Xu *et al.*, 2000). Als drei Jahre später Dekker *et al.* die SecB-Kristallstruktur von *E. coli* veröffentlicht, konnten die früheren Beobachtungen bestätigt werden (Dekker *et al.*, 2003). Das Innere des Peptidbindungskanals war auch hier mit überwiegend aromatischen, hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet. Der an der Oberfläche des Dimers liegende Eingang in den Bindungskanal besteht vornehmlich aus nicht-aromatischen, hydrophoben Resten, welche mit den hydrophoben Strukturen der entfalteten Vorläuferproteine wechselwirken können. Offenbar spielt auch der am Eingang des Bindungskanals liegende C-Terminus der jeweiligen Monomere eine Rolle bei der Substratbindung, denn Mutanten mit verkürztem C-Terminus haben eine verringerte Bereitschaft, entfaltete Substrate zu binden. Durch einen Überschuss an C-terminal verkürztem SecB kommt es *in vivo* zu einem verminderten Proteinexport (Diamond und Randall, 1997).

Die Substrataffinität zu einer einzelnen der vier Bindungsstellen ist recht gering, jedoch steigt anscheinend die Affinität zwischen SecB und Substrat, wenn mehrere Bindungsstellen gleichzeitig besetzt werden (Zhou und Xu, 2005). Frühere EPR-Untersuchungen zur Bindung von SecB an das MTS-gelabelte Vorläuferprotein des Galactosebindungsproteins (preGBP, von engl. *Precursor*) zeigen, dass es zu einer größeren Wechselwirkung verschiedener Aminosäuren im Bereich des  $\beta 2$ -Faltblattes auf der Dimeroberfläche und am Eingang in den Peptidbindungskanal mit dem entfalteten Vorläuferprotein kommt. Kleinere Wechselwirkungen ergeben sich in den oberen Bereichen der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Helices sowie an den  $\beta 3$ -,  $\beta 4$ - und  $\beta 1$ -Faltblättern. Für längere Polypeptide besteht anscheinend die Möglichkeit, dass sie sich um das Tetramer herumwickeln, um somit mehrere Bindungsstellen gleichzeitig zu besetzen (Crane *et al.*, 2006).

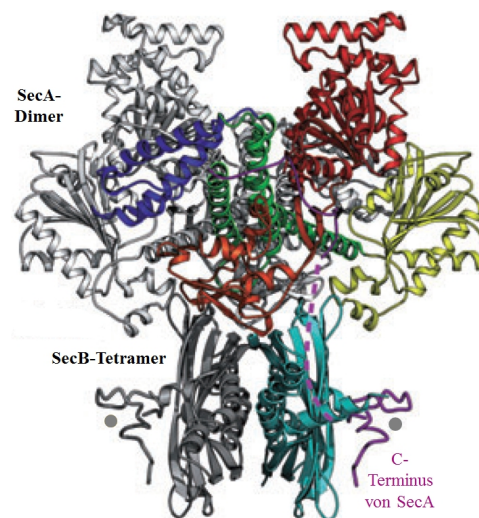
SecB dirigiert das gebundene Vorläuferprotein in den Exportkanal über die spezifische Wechselwirkung mit der membrangebundenen, dimeren ATPase SecA (Fekkes *et al.*, 1997). Die Bindungsaffinität von SecB zu SecA steigt, sobald SecB in Komplex mit einem Vorläuferprotein vorliegt. Die SecB-Bindungsstelle an SecA ist am extrem exponierten C-Terminus von SecA lokalisiert (Zhou und Xu, 2005). Die Entfernung der letzten 22

C-terminalen Aminosäuren an SecA geht einher mit einem Verlust der SecB-vermittelten Proteintranslokation (Fekkes *et al.*, 1997).

Die SecB-Kristallstruktur von *H. influenzae* im Komplex mit den letzten 27 C-terminalen Aminosäuren von SecA gibt Aufschluss über die Interaktion zwischen beiden Proteinen (Zhou und Xu, 2003). SecB nutzt die sehr gut lösungsmittelzugänglichen, insgesamt acht nebeneinanderliegenden  $\beta$ -Faltblätter des SecB-Dimers, um mit dem Zink-stabilisierten C-Terminus eines SecA-Monomers in Kontakt zu treten (vgl. Abb. 1.8 auf Seite 15). Hierbei wird die SecB-Anlagerung wesentlich durch vier SecA-Aminosäuren beeinflusst. Der Austausch einer dieser Aminosäuren gegen Alanin verhindert bereits die Bindung von SecB (Zhou und Xu, 2005). Nach erfolgter Bindung von SecB an SecA liegt das noch von SecB komplexierte Vorläuferprotein in unmittelbarer Nähe zu SecA und wird an dieses übergeben, während SecB den Komplex verlässt (Zhou und Xu, 2005).



**Abb. 1.7:** Bändermodell des SecB-Tetramers in seitlicher Ansicht. Hervorgehoben sind die überwiegend hydrophoben Aminosäuren im Bereich des Peptidbindungskanals. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in jedem Monomer nur einer der beiden Bindungsbereiche markiert (Xu *et al.*, 2000).



**Abb. 1.8:** Bändermodell von SecA (oben) in Komplex mit SecB (unten). Dargestellt ist ein hypothetisches Modell der Bindung zwischen SecA und SecB. Die Kristallstruktur der C-terminalen SecA-Region (lila) in Komplex mit dem SecB-Tetramer (grau-türkis) wurde manuell mit dem SecA-Dimer verbunden. Daraus resultiert auch die händisch eingezeichnete, gepunktete Verlängerung zwischen dem C-Terminus und dem Rest von SecA (Zhou und Xu, 2005).

## 1.4 Das Substrat preMBP

Das *Maltose-Binding Protein* (MBP), auch bekannt als MalE, ist ein 370 Aminosäuren umfassendes, 40,6 kDa schweres, aus zwei Domänen bestehendes Polypeptid. Das periplasmatische Protein wird im Cytoplasma in Form eines Vorläuferproteins preMBP synthetisiert, welches zusätzlich eine 26 Aminosäure lange, N-terminale Signalsequenz trägt und insgesamt ein Molekulargewicht von 43,3 kDa aufweist. Das reife Protein ist im Periplasma an der Aufnahme von Maltose sowie der Chemotaxis beteiligt (Spurlino *et al.*, 1991).

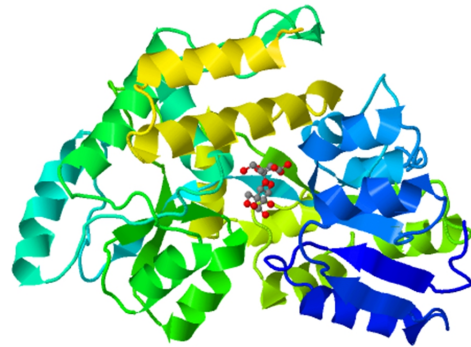
Die effiziente Aufnahme von Maltose, den längerkettigen Maltodextrinen sowie anderer Zucker aus dem umgebenden Medium in die Zelle erfordert die Anwesenheit einer speziellen Pore, des Maltoporins (auch als LamB-Protein bezeichnet), in der äußeren Bakterienmembran. LamB ist ein trimeres Protein, wobei jede der drei Untereinheiten einen aus 18 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehenden Kanal bildet.

MBP gehört zum Maltose/Maltodextrin System, welches neben der Maltoseaufnahme auch für die Katabolisierung von  $\alpha(1\rightarrow4)$ -verknüpften Glucosepolymeren (Maltodextrin) verantwortlich ist. Das Maltose/Maltodextrin Transportsystem gehört zur Gruppe des periplasmatischen ABC-Transportsystems (von engl. *ATP-Binding Cassette*) von Gramnegativen Bakterien. MBP erkennt und bindet Maltose oder Maltodextrin mit hoher Affinität, die im Periplasma in hoher Konzentration vorliegen und übergibt sie für den weiteren Transport durch die Cytoplasmamembran an den membrangebundenen MalFGK<sub>2</sub>-Komplex. Dieser umfasst das Protein MalF (57 kDa), das integrale Membranprotein MalG (32,2 kDa) sowie zwei MalK-Proteine (je 40,7 kDa), welche auf cytosolischer Seite mit dem Transmembrankomplex assoziiert sind und eine ATPase-Funktion besitzen (Spurlino *et al.*, 1991; Boos und Shuman, 1998).

MBP besteht aus zwei fast symmetrischen Flügeln, zwischen denen sich die Bindungsstelle für Maltose befindet (vgl. Abb. 1.9 auf Seite 17). Substratassoziierte und substratfreie MalE-Proteine unterscheiden sich grundlegend in ihrer Konformation. Durch die Substratbindung erfährt das MBP eine Konformationsänderung, bei der sich die beiden Flügel um das Substrat schließen. Die Maltose wird durch elf Wasserstoffbrücken sowie van-der-Waals-Kräfte von MBP komplexiert (Spurlino *et al.*, 1991). Im maltosefreien Zustand sind die Flügel geöffnet, so dass die Bindungsstelle gute Lösungsmittelzugänglichkeit besitzt. MBP interagiert über diese beiden Flügel mit den Untereinheiten MalF und MalG des ABC-Transporters der Cytoplasmamembran. Durchgeführte Untersuchungen

in Kombination mit den Erkenntnissen aus den Kristallstrukturdaten von MBP legen die Schlussfolgerung nahe, dass einer der Flügel des MBP in Kontakt mit MalF tritt und der zweite mit MalG.

Die Isolierung von Wildtyp-preMBP gelingt kaum in großen Mengen, da nach der Translation *in vivo* die Signalsequenz sehr schnell durch die Signalpeptidase abgespalten wird. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit zwei preMBP-Mutanten gearbeitet, die beide eine Mutation in der Signalsequenz an Aminosäureposition 14 tragen, wodurch die Abspaltung der Signalsequenz ausbleibt. Das ursprüngliche Alanin wurde durch Glutaminsäure ersetzt (preMBP A14E). Untersuchungen zur Faltung und Interaktion mit dem Chaperon SecB zeigen, dass sich durch diese Mutation keinerlei Unterschiede zum Wildtyp ergeben. Die zweite preMBP-Mutante trägt eine zusätzliche Mutation im reifen Abschnitt des Proteins an Aminosäureposition 312, wo das Alanin durch ein Cystein ersetzt wurde, um die Bindung eines Spinlabels zu ermöglichen (preMBP A312C) (Krishnan, 2004).



**Abb. 1.9:** Bändermodell von MBP aus *E. coli* im Komplex mit Maltose [PDB-Code: 1ANF, RCSB PDB (Quiocho *et al.*, 1997)].

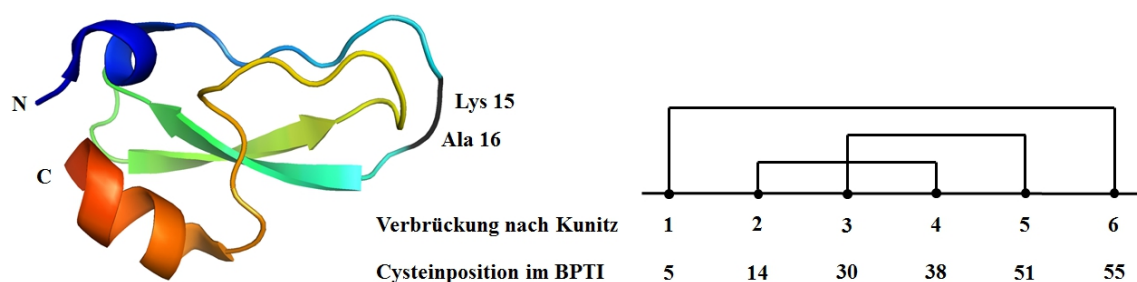
## 1.5 Das Modellsubstrat BPTI

Der *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI), auch bekannt als Aprotinin, ist eines der am häufigsten untersuchten globulären Proteine. Er dient unter anderem zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (Ascenzi *et al.*, 2003). Das Protein besitzt eine molekulare Masse von 6,5 kDa und besteht aus 58 Aminosäuren (Mannucci, 1998). Am C- und N-Terminus besitzt es eine  $\alpha$ -Helix und in der Mitte zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, die über einen *Hairpin-Loop* miteinander verbunden sind (Ascenzi *et al.*, 2003) (vgl. Abb. 1.10 auf Seite 18). Seine Raumstruktur wird von drei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 5 – 55, 14 – 38 und 30 – 51 stabilisiert (Panse *et al.*, 2001) sowie durch einen hydrophoben Kern aus nicht polaren Aminosäureseitenketten. Durch die charakteristische 1 – 6, 2 – 4 und 3 – 5 Verknüpfung der sechs Cysteine gehört BPTI zur Familie der Serinprotease-Inhibitoren des Kunitz-Typs (Kunitz und Northrop, 1936; Walden, 2002).



Namensgeber der Gruppe ist Moses Kunitz, der im Jahr 1936 BPTI als ersten Vertreter dieser Gruppe aus dem Rinderpankreas isolierte. Die Proteine des Kunitz-Typs sind allesamt basische Proteine mit einem geringen Molekulargewicht. Sie besitzen strukturelle Ähnlichkeit, unterscheiden sich jedoch signifikant in ihrer Aminosäuresequenz sowie in ihrer jeweiligen physiologischen Funktion.

Weiterhin charakteristisch für Serinprotease-Inhibitoren des Kunitz-Typs ist die exponierte Schleife, die das aktive Zentrum trägt (Walden, 2002). Beim BPTI liegt dieses zwischen den Aminosäuren Lysin 15 und Alanin 16 (Dittrich und Kanchanawarin, 2011).



**Abb. 1.10:** Links: Kristallstruktur von BPTI [PDB-Code: 1BPI, RCSB PDB (Parkin *et al.*, 1996)]. Rechts: Schematische Darstellung der Cysteinverbrückung des Kunitz-Typs. Die schwarzen Punkte symbolisieren die Cysteinreste in der Aminosäuresequenz (Walden, 2002).

Die physiologische Funktion von BPTI besteht in der Inhibierung von Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein und ist nicht nur im bovinen Pankreas, sondern in nahezu allen bovinen Geweben insbesondere auch in Mastzellen zu finden (Walden, 2002). Durch die Bindung von BPTI an das aktive Zentrum des Trypsins, mit dem Serin 195, wird die vorzeitige Enzymaktivität des Trypsins, die katalytische Triade, gehemmt, bis das Trypsin an seinem Zielort im Organismus, dem Gastrointestinaltrakt, angelangt ist. Die Inhibierung des Trypsins dient der Verhinderung des Selbstverdaus durch körpereigene Verdauungsenzyme (Koolman und Röhm, 2003). Um Trypsin spezifisch zu inhibieren, jedoch die eigene Spaltung zu verhindern, liegt das aktive Zentrum von BPTI räumlich getrennt zum reaktiven Serin 195 des Trypsins (Dittrich und Kanchanawarin, 2011).

BPTI wurde im Arbeitskreis von Prof. Trommer der TU Kaiserslautern bereits in früheren Arbeiten als Modellsubstrat zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt (Panse *et al.*, 2001; Haimann, 2012). *In vivo* besitzt das Chaperon SecB eine hohe Substratspezifität gegenüber sekretorischen Vorläuferproteinen, die es *in vitro* allerdings verliert und so beispielsweise auch an das Modellsubstrat BPTI bindet. Das BPTI muss hierzu jedoch in einem bindungskompetenten, entfalteten Zustand vorliegen. In der

vorliegenden Arbeit wurde einerseits die chemische Modifizierung der Cysteine gewählt und andererseits der Einsatz einer zwischenzeitlich im Arbeitskreis generierten BPTI-Mutante, bei der alle natürlichen Cysteine durch Alanin ersetzt wurden (bezeichnet als all-Ala-BPTI) (Haimann, 2012).

## 1.6 EPR-Spektroskopie

Die Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (EPR) oder auch Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) ist eine spektroskopische Methode, die auf der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und magnetischen Momenten beruht. Ähnlich der Kernresonanz-Spektroskopie (NMR), welche die magnetischen Momente der Atomkerne untersucht, basiert die EPR-Spektroskopie auf der Untersuchung von magnetischen Momenten der Elektronen. Die EPR-Spektroskopie ist eine zerstörungsfreie Methode, die beispielsweise Informationen über Struktur, Dynamik und lokale Umgebung der paramagnetischen Zentren liefert. Solche Zentren besitzen ein oder mehrere ungepaarte Elektronen. In biologischen Systemen können dies unter anderem Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) oder Radikale sein, die als Zwischenprodukte in Elektronentransferreaktionen oder strahlungsinduziert in der DNA entstehen (Schweiger, 2003; Lottspeich und Engels, 2012).

Liegen in einem Molekül mehrere paramagnetische Zentren vor, liefern EPR-Untersuchungen Informationen über die Abstände dieser Zentren. In diamagnetische Systeme, in denen alle Elektronen gepaart vorliegen, können sog. Spinlabels eingebracht werden, um auch sie mittels EPR-Spektroskopie untersuchen zu können (Lottspeich und Engels, 2012). Hierbei kommen insbesondere Nitroxid-Radikale zum Einsatz, die kovalent an eine definierte Position im Molekül gebunden werden. Diese Methode bezeichnet man als *Site-Directed Spinlabeling* (Zhou *et al.*, 2000). Kleine Spinlabel, wie beispielsweise das in der vorliegenden Arbeit verwendete 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- $\Delta^3$ -pyrrolidin-3-methylthiosulfonat (MTS), eignen sich sehr gut aufgrund der hohen Spezifität gegenüber Thiolgruppen für die Modifizierung von Cysteinen (Berliner *et al.*, 1982). Durch ortsgerichtete Mutagenese ist es inzwischen möglich, Cysteine gezielt an speziellen Positionen in Proteinen einzufügen, um diese Stellen anschließend mittels Spinlabelreagenzien zu modifizieren (Hubbell und Altenbach, 1994).

### 1.6.1 Theoretische Grundlagen

Neben Masse und Ladung besitzt jedes Elektron einen quantenmechanischen Eigendrehimpuls, den sogenannten Elektronenspin  $\vec{s}$  (von engl. *spin* für Drehung, Drall). Für die Länge des Vektors gilt:

$$|\vec{s}| = \hbar \cdot \sqrt{s(s+1)}. \quad (1)$$

Dabei ist  $s = \frac{1}{2}$  die Spinquantenzahl und  $\hbar$  das Planck'sches Wirkungsquantum  $h$  dividiert durch  $2\pi$ . Der Elektronenspin ist mit einem magnetischen Moment  $\vec{\mu}_e$  verknüpft, das zum Elektronenspin entgegengesetzt orientiert ist:

$$\vec{\mu}_e = -g_e \cdot \frac{e}{2m_e} \cdot \vec{s}. \quad (2)$$

Hierbei steht  $e$  für die Elementarladung,  $m_e$  für die Ruhemasse des Elektrons und  $g_e$  für den Landé-Faktor, dessen Wert für ein freies Elektron 2,00232 beträgt. Für die z-Komponente des magnetischen Moments  $\mu_{e,z}$  ergibt sich somit unter Einbeziehung des Bohr'schen Magnetons  $\mu_B = \frac{e \cdot \hbar}{2 \cdot m_e}$ :

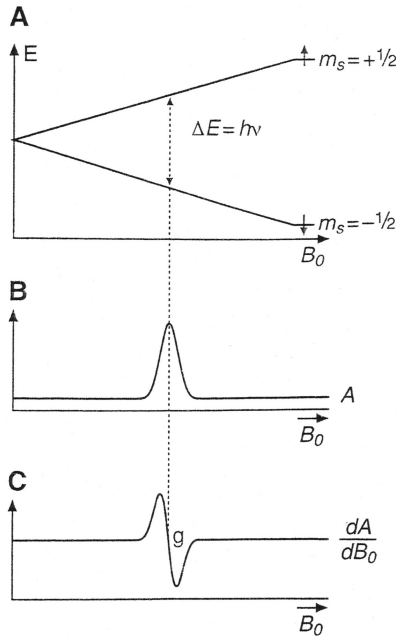
$$\mu_{e,z} = -g_e \cdot \mu_B \cdot m_s. \quad (3)$$

Die beiden Spinorientierungen  $m_s = \pm \frac{1}{2}$  sind in Abwesenheit eines äußeren Magnetfeldes energetisch entartet. Wird ein äußeres Magnetfeld mit der Stärke  $B_0$  in z-Richtung angelegt, so treten Feld und magnetisches Moment  $\mu_{e,z}$  in Wechselwirkung, wodurch die Entartung beider Spinorientierungen aufgehoben wird und es zu einer Aufspaltung der Spinzustände kommt. Dieser Effekt ist nach seinem Entdecker benannt und wird als Zeeman-Effekt oder Zeeman-Aufspaltung bezeichnet. Für die Energie  $E$  der beiden Zustände gilt:

$$E_{m_s=+\frac{1}{2}} = \frac{1}{2} \cdot g_e \cdot \mu_B \cdot B_0. \quad (4)$$

Für die beiden Spinorientierungen  $m_s = \pm \frac{1}{2}$  ergibt sich somit eine Energiedifferenz  $\Delta E$ , die proportional zur Stärke des äußeren Magnetfeldes  $B_0$  ist (vgl. Teil A in Abb. 1.11):

$$\Delta E = E_{m_s=+\frac{1}{2}} - E_{m_s=-\frac{1}{2}} = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (5)$$



**Abb. 1.11:** **A:** Zeeman-Aufspaltung der beiden Energieniveaus eines Eielektronensystems im homogenen Magnetfeld  $B_0$ . **B:** Erhaltene Absorptionslinie bei Erfüllen der Resonanzbedingungen. **C:** Durch Feldmodulation erhaltene erste Ableitung der Absorptionslinie (Lottspeich und Engels, 2012).

Durch elektromagnetische Strahlung können Übergänge aus dem  $m_s = -\frac{1}{2}$ -Niveau in das energetisch höhere  $m_s = +\frac{1}{2}$ -Niveau induziert werden. Hierzu muss die Energie der Strahlung die korrekte Frequenz  $\nu$  besitzen, welche durch die Resonanzbedingung bestimmt ist:

$$h\nu = \Delta E = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0. \quad (6)$$

Ist die Resonanzbedingung erfüllt, tritt die magnetische Feldkomponente der elektromagnetischen Strahlung mit dem magnetischen Moment des Elektronenspins in Wechselwirkung. Die dabei erhaltene Absorptionslinie und die daraus durch Feldmodulation erhaltene erste Ableitung sind in Abbildung 1.11 (Teil B und C) dargestellt.

Die Resonanz im Molekül unterscheidet sich von der eines freien Elektrons. Diese Abweichung beschreibt der sogenannte  $g$ -Faktor mit der Abschirmkonstante  $\sigma$ , der die Abweichung gegenüber dem  $g_e$ -Wert für ein freies Elektron charakterisiert.

$$g = (1 - \sigma) \cdot g_e. \quad (7)$$

Diese Abweichungen werden durch Kopplungen zwischen Spin- und Bahnmoment der Elektronen im Molekül verursacht. Somit gilt:

$$\Delta E = h\nu = g \cdot \mu_B \cdot B_0. \quad (8)$$

Typische EPR-Spektrometer arbeiten im Tesla-Bereich bei 3400 G (X-Band) und hierdurch liegen die Resonanzfrequenzen im Mikrowellenbereich (9,5 GHz). Bei EPR-Messungen im *Continuous Wave* (cw)-Betrieb wird die eingestrahlte Mikrowellenfrequenz konstant gehalten und die Stärke des äußeren Magnetfeldes variiert.

### 1.6.2 Die Hyperfeinstruktur

Für ein ungepaartes Elektron sollte sich im EPR-Spektrum nach den bisherigen Überlegungen nur eine einzelne Absorptionslinie ergeben, die sich aus dem Übergang von  $m_s = -\frac{1}{2}$  nach  $m_s = +\frac{1}{2}$  ergibt. Tatsächlich beobachtet man jedoch mehr als eine Linie, die sogenannte Hyperfeinstruktur. Diese ergibt sich aus der Wechselwirkung des magnetischen Moments des Elektrons mit dem magnetischen Moment eines benachbarten Atomkerns und ist unabhängig von der Stärke  $B_0$  des äußeren Magnetfeldes (Lottspeich und Engels, 2012). Der Kernspin induziert ein zusätzliches Magnetfeld, das sich vektoriell zum äußeren Magnetfeld  $B_0$  addiert. Für das daraus resultierende lokale Magnetfeld  $B_{\text{lokal}}$  des Elektrons ergibt sich somit:

$$B_{\text{lokal}} = B_0 + a \cdot m_I. \quad (9)$$

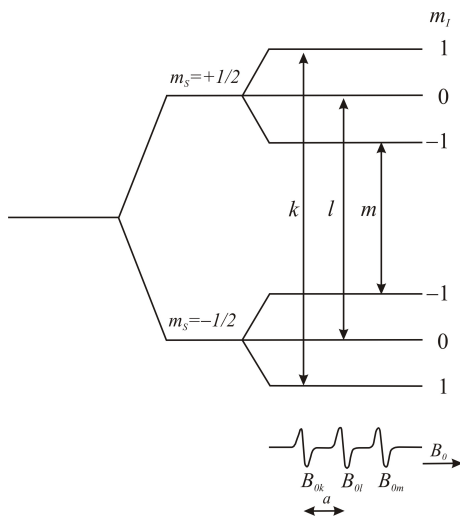
Hierbei ist  $a$  die Hyperfeinkopplungskonstante, die dem Abstand der Linien im Spektrum entspricht, und  $m_I$  die magnetische Kernspinquantenzahl. Die Resonanzbedingung kann somit wie folgt erweitert werden:

$$h\nu = g \cdot \mu_B \cdot (B_0 + a \cdot m_I). \quad (10)$$

Im Allgemeinen bewirkt die Kopplung von Elektron und Kern eine Aufspaltung des Absorptionssignals in  $(2I + 1)$  Linien. Für einen Kernspin von  $I = 1$ , wie er im  $^{14}\text{N}$ -Kern des Nitroxid-Radikals vorkommt, ergibt sich demnach eine Aufspaltung in drei Linien (vgl. Abb. 1.12).

### 1.6.3 EPR-Spektren immobilisierter Proben und Abstandsmessungen

Radikale in flüssiger Lösung rotieren schnell und ungehindert um ihre eigene Achse, so dass sie in Bezug auf das äußere Magnetfeld  $B_0$  keine bevorzugte Orientierung aufweisen. Die Rotationskorrelationszeit ist kürzer als die Zeit, die für die Absorption und die



**Abb. 1.12:** Hyperfeinaufspaltung des EPR-Signals durch Wechselwirkung des Elektrons mit einem Kern der Kernspinnquantenzahl  $I = 1$  (Wertz und Bolton, 1972).

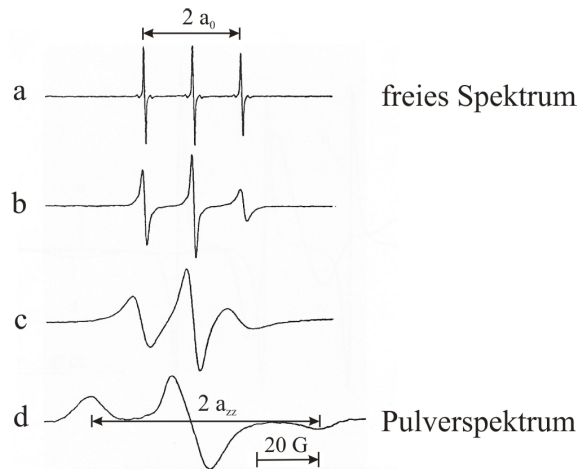
Relaxation im angeregten Zustand notwendig ist. Es resultiert ein isotropes Absorptionsspektrum mit scharfen Linien, welches unabhängig von der Orientierung zum äußeren Magnetfeld ist. Die Anisotropie der Hyperfeinkopplungskonstante  $a$  und die des  $g$ -Faktors mitteln sich heraus, so dass sich folgende Mittelwerte für die Hyperfeinkopplungskonstante  $a$  sowie für den  $g$ -Faktor ergeben:

$$a_0 = \frac{1}{3}(a_{xx} + a_{yy} + a_{zz}), \quad (11)$$

$$g_0 = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}). \quad (12)$$

Wird jedoch die Beweglichkeit des Radikals durch Erhöhung der Viskosität des Lösungsmittels, durch sterische Hinderung oder durch Einfrieren der Probe eingeschränkt, zeigt jedes Molekül eine festgelegte Orientierung zum äußeren Magnetfeld und die EPR-Spektren weisen orientierungsabhängige (anisotrope) Anteile auf. Da die Einzelspektren aller intermediär orientierten Moleküle zeitlich nicht mehr ausgemittelt werden, ergibt sich die Summe der einzelnen Signalamplituden. Hierdurch verschiebt sich die Absorptionslinie um den Wert  $\Delta B$  und die Linienbreite des Spektrums erhöht sich. Wenn im Extremfall keine Rotation der Radikale in flüssiger Lösung mehr möglich ist, verhalten sie sich wie ein Feststoff und es resultiert ein sog. Pulverspektrum (vgl. Abb. 1.13).

Befinden sich zwei immobilisierte, ungepaarte Elektronen  $A$  und  $B$  in einem Abstand  $r_{AB}$  zueinander in einem Molekül (z.B. in einem doppelt spinmarkierten Protein), kann eine Kopplung zwischen diesen beiden Elektronen auftreten (Dipol-Dipol-Kopplung) (Lottspeich und Engels, 2012). Über die Verschiebung der Absorptionslinie  $\Delta B$  erhält man

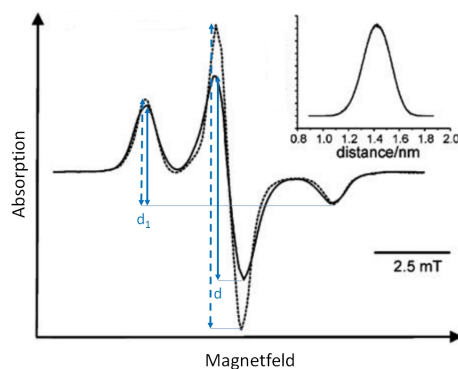


**Abb. 1.13:** Normiertes EPR-Spektrum von Di-*tert.*-butyl-nitroxid in Ethylenglykol bei 25 °C (a), -25 °C (b), -80 °C (c) und -150 °C (d) (Griffith und Waggoner, 1969).

Abstandsinformationen  $r_{AB}$  zwischen zwei immobilisierten paramagnetischen Zentren durch folgenden Zusammenhang:

$$\Delta B = \pm \frac{3 \cdot g_e \cdot \mu_B \cdot (3 \cos^2 \theta_{AB} - 1)}{4 \cdot r_{AB}^3}. \quad (13)$$

Hierbei steht  $\theta_{AB}$  für den Winkel zwischen dem Abstandsvektor  $r$  und dem angelegten äußeren Magnetfeld  $B_0$ . Durch diese Dipol-Dipol-Wechselwirkung wird das Absorptionsspektrum breiter und das Verhältnis der Höhen  $d_1$  zu  $d$  umso größer, je näher die paramagnetischen Zentren sind (vgl. Abb. 1.14) (Steinhoff, 2004). Dieses Verhältnis ermöglicht eine erste Abschätzung des vorliegenden Abstands. Mit dieser Methode können im cw-Betrieb Abstände im Bereich von 10 Å bis 20 Å ermittelt werden (Steinhoff *et al.*, 1991).

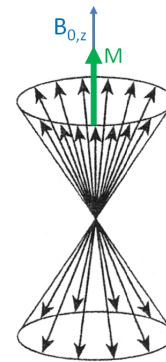


**Abb. 1.14:** Auswirkung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung auf Absorptionsspektren: EPR-Spektrum mit einem Spinlabel ( $\cdots$ ) und mit zwei hinreichend nahen Spinlabeln ( $\text{—}$ ). Abb. nach Steinhoff, 2004

### 1.6.4 Gepulste EPR-Messungen: *Double Electron Electron Resonance* (DEER)

Mit cw-EPR-Messungen gelingt die Auflösung von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen in einem Bereich von 10 Å bis 20 Å. Für schwächere Kopplungen zu weiter entfernten Kernen oder ungepaarten Elektronen sind gepulste EPR-Experimente notwendig. Bei der cw-EPR-Technik wird die Frequenz der eingestrahlten Mikrowelle konstant gehalten und das äußere Magnetfeld verändert, um Resonanzen mit der Probe zu detektieren. Im Unterschied hierzu wird bei gepulsten EPR-Messungen das äußere Magnetfeld konstant gehalten und kurze Mikrowellenpulse mit einer bestimmten Frequenz auf die zu untersuchende Probe eingestrahlt. Mit PELDOR (*Pulsed Electron Double Resonance*), auch als DEER (*Double Electron Electron Resonance*) bezeichnet, sind Abstände von über 80 Å zwischen zwei Elektronenspins detektierbar (Lottspeich und Engels, 2012).

Für einen Elektronenspin ist die Länge des s-Vektors sowie die z-Komponente festgelegt, die x- bzw. y-Komponenten sind jedoch aufgrund der Heisenbergschen Unschärferelation nicht exakt bestimmbar. Folglich liegt das magnetische Moment  $\mu_{e,z}$  der Spins nicht exakt parallel zum äußeren Magnetfeld  $B_{0,z}$  und die Kraft des Magnetfeldes versucht die magnetischen Momente der Elektronenspins parallel auszurichten. Hierdurch präzedieren die Elektronenspins und die dazu antiparallelen magnetischen Momente auf zwei Kegeln um die Magnetfeldachse  $B_{0,z}$  (vgl. Abb. 1.15). Da insgesamt mehr magnetische Momente parallel zum Magnetfeld orientiert sind als antiparallel, erfährt die Probe eine Magnetisierung  $M$  in Richtung des Magnetfeldes. Die Frequenz dieser Präzession ist magnetfeldabhängig und wird als Larmor-Frequenz bezeichnet.



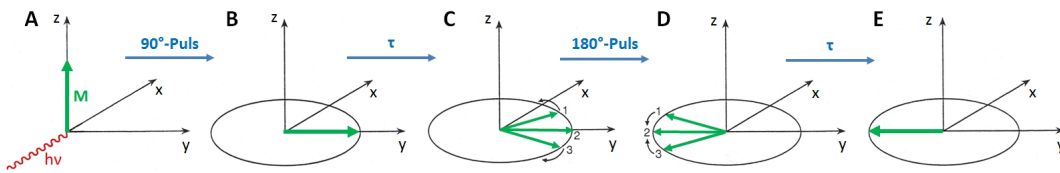
**Abb. 1.15:** Resultierende Magnetisierung  $M$  (grün) in Richtung des äußeren Magnetfeldes  $B_{0,z}$  (blau). Die schwarzen Pfeile stellen die magnetischen Momente  $\mu_{e,z}$  der Elektronenspins dar. Abb. nach Lottspeich und Engels, 2012.

Bei gepulsten EPR-Experimenten nutzt man Rechteckpulse. Bei diesen wird die Mikrowellenstrahlung eingeschaltet und innerhalb von Nanosekunden wieder ausgeschaltet. Hierdurch besitzen die Pulse keine klar definierte Mikrowellenfrequenz, sondern decken eine gewisse Frequenzbreite ab. Folglich wird bei konstantem Magnetfeld ein größerer



Bereich des Absorptionsspektrums angeregt.  $90^\circ$ - und  $180^\circ$ -Pulse drehen den Elektronenspin um  $90^\circ$  bzw.  $180^\circ$ . Die Größe des Drehwinkels kann über die Pulslänge und Pulsamplitude verändert werden. Somit hat ein  $180^\circ$ -Puls entweder die doppelte Länge oder Amplitude im Vergleich zu einem  $90^\circ$ -Puls.

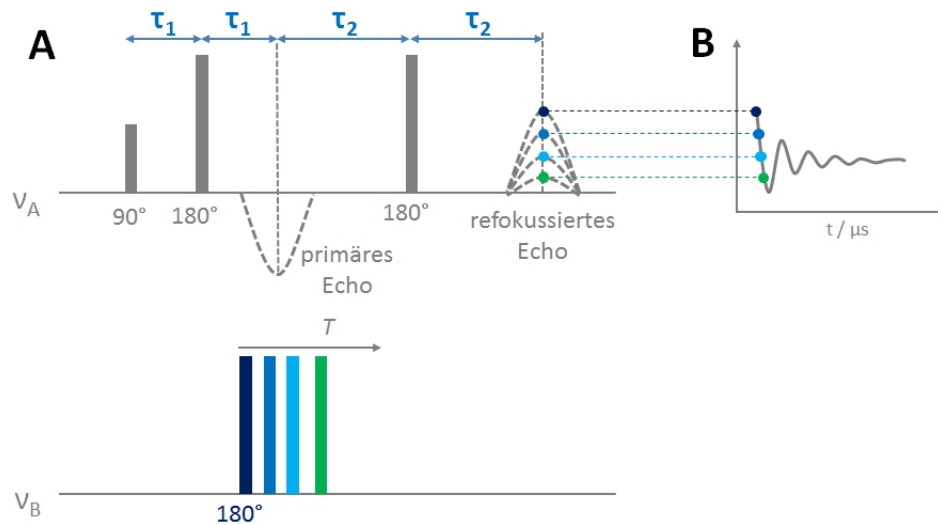
Wird ein  $90^\circ$ -Puls auf die Probe eingestrahlt (Teil A in Abb. 1.16), erzeugt dieser eine Wechselwirkung mit den Spins und induziert eine Gleichverteilung auf beide Energieniveaus. Somit addieren sich die einzelnen magnetischen Momente entlang der z-Achse zu null. Die Magnetisierung  $M$  wird von der z- auf die +y-Achse gedreht (B) und die Spins präzedieren mit ihrer entsprechenden Larmor-Frequenz um die z-Achse (C). Nach einem bestimmten Zeitintervall  $\tau$ , nachdem sich die Elektronenspins aufgrund ihrer unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeit unterschiedlich weit auf der x,y-Ebene von der +y-Achse entfernt haben, strahlt man einen  $180^\circ$ -Puls auf die Probe ein, der die Magnetisierungslaufrichtung um  $180^\circ$  kippt (D). Da die Elektronenspins hierbei sowohl ihre Drehrichtung als auch ihre Rotationsgeschwindigkeit beibehalten, refokussieren sie und es entsteht ein Spinecho (nach seinem Entdecker auch als Hahn-Echo bezeichnet) (E).



**Abb. 1.16:** Schematische Darstellung der Magnetisierungsvektoren  $M$  während eines 2-Puls-Experiments. **A:** Magnetisierung  $M$  entlang des äußeren Magnetfeldes  $B_{0,z}$ . **B:**  $M$  nach einem  $90^\circ$ -Puls. **C:** Defokussierung nach einem Zeitintervall  $\tau$ . **D:** Inversion der Spins nach einem  $180^\circ$ -Puls und Refokussierung im Zeitintervall  $\tau$ . **E:** Hahn-Echo zum Zeitpunkt  $2\tau$  nach dem anfänglichen  $90^\circ$ -Puls (Lottspeich und Engels, 2012).

Mit Hilfe des DEER-Experiments kann selektiv die dipolare Kopplung zwischen zwei ungepaarten Elektronen A und B detektiert werden. Hierfür sind zwei unterschiedliche Mikrowellenfrequenzen notwendig, die unabhängig voneinander beeinflusst werden können und die zuvor ermittelt werden müssen. Der Frequenzunterschied für Nitroxide beträgt ca. 65 MHz. Die verwendete Pulssequenz ist in Abbildung 1.17 (Teil A) dargestellt.

Über die erste Mikrowelle wird die Detektionssequenz  $90^\circ$ - $180^\circ$ - $180^\circ$  auf den Elektronenspin A (Observerspin) mit der Frequenz  $\nu_A$  eingestrahlt. Nach dem Zeitintervall  $2\tau_1$  wird das primäre Echo (Hahn-Echo) generiert, welches der Refokussierung aller Wechselwirkungen dient. Nach dem  $90^\circ$ -Puls kommt es zu einer Kippung der Magnetisierung von der +z-Achse um  $90^\circ$  in die +y-Achse (A und B in Abb. 1.16). Durch die unterschied-



**Abb. 1.17:** **A:** Schematische Darstellung der DEER-Pulssequenz mit vier Pulsen.  $\nu_A$  (Observerfrequenz) und  $\nu_B$  (Pumpfrequenz) stehen für die zwei unterschiedlichen Mikrowellenfrequenzen. **B:** DEER-Zeitspektrum der 4-Puls-Sequenz. Abb. nach Lottspeich und Engels, 2012 und Haimann, 2012.

lichen Larmor-Frequenzen aller Elektronenspins erfolgt eine freie Präzessionsbewegung auf der x,y-Ebene um die z-Achse (C). Der anschließende  $180^\circ$ -Puls führt zu einer Kippung aller Spins um  $180^\circ$  in der x,y-Ebene und einer Refokussierung (D und E).

Nach dem ersten  $180^\circ$ -Puls wird innerhalb eines Zeitintervalls  $T$  ein Pumpimpuls mit der Frequenz  $\nu_B$  über die zweite Mikrowelle eingestrahlt, der den Spin des Elektrons B (Pumpspin) invertiert. Sind die beiden ungepaarten Elektronen A und B gekoppelt, führt die Inversion des Elektronenspins von B zur einer Änderung des magnetischen Feldes am Observerspin A und folglich auch zu einer Änderung der Echoamplitude. In der darauffolgenden Zeit  $\tau_2$  relaxiert das System. Dieses Zeitintervall wird als dipolare Evolutionszeit bezeichnet. Durch einen zweiten  $180^\circ$ -Puls mit der Observerfrequenz  $\nu_A$  wird schließlich nach dem Zeitintervall  $2(\tau_1 + \tau_2)$  ein zweites refokussiertes Echo generiert, welches über einen Detektor aufgezeichnet wird.

Jeder Durchlauf der Pulssequenz erzeugt einen Messpunkt im DEER-Signal (vgl. Teil B in Abb. 1.17). Bewegt man nun den Pumpimpuls innerhalb des Zeitintervalls  $T$  zwischen den beiden  $180^\circ$ -Observerpulsen, resultiert eine Oszillation der Echoamplitude. Die Frequenz dieser Oszillation entspricht der Frequenz der Elektron-Elektron-Kopplung und ist vom Abstand der beiden paramagnetischen Zentren abhängig. Aus der ermittelten Frequenz lässt sich direkt der Abstand der beiden ungepaarten Elektronen errechnen (Jeschke, 1998; Lottspeich und Engels, 2012).

## 2 Problemstellung

SecB ist ein homotetrameres, cytosolisches Chaperon von *E. coli* und ist an der Translokation von neu synthetisierten Polypeptiden aus dem Cytoplasma über die Cytoplasmamembran in den periplasmatischen Raum beteiligt (den Blaauwen und Driessen, 1996; Randall *et al.*, 1998). Es verhindert die vorzeitige Faltung oder Aggregation von naszierenden Peptidketten durch Bindung und hält diese somit in einem translokationskompetenten Zustand (Hardy und Randall, 1989; Driessen *et al.*, 1998). *In vitro* wechselwirkt das Chaperon mit einer Vielzahl entfalteter Proteine wie beispielsweise dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI) (Lecker *et al.*, 1990; Fekkes *et al.*, 1995; Panse *et al.*, 1998). Er wurde im Arbeitskreis Biochemie der Technischen Universität Kaiserslautern bereits als Modellsubstrat für SecB im Rahmen von Faltungsstudien eingesetzt. Seine dreidimensionale Struktur wird durch drei Disulfidbrücken stabilisiert und eine Reduktion dieser führt unmittelbar zur Entfaltung des Proteins. *Continuous Wave*-EPR-Messungen bei Tieftemperatur erbrachten in der Vergangenheit den Hinweis auf eine Konformationsänderung des Chaperons in Form einer Verbreiterung der gesamten Tetramerstruktur durch eine Substratbindung (Panse *et al.*, 2001).

*In vivo* wechselwirkt SecB mit einer Vielzahl an Vorläuferproteinen wie zum Beispiel dem Vorläuferprotein des *Maltose-Binding Proteins* (preMBP). Das reife MBP dient im Periplasma von Gram-negativen Bakterien sowohl als Rezeptor für die Chemotaxis, als auch für den Transport von Maltose. PreMBP besitzt eine N-terminale Zielsteuerungssequenz mit einer Länge von 26 Aminosäuren, um die das reife MBP verkürzt ist (Duplay *et al.*, 1984).

Die EPR-Spektroskopie in Verbindung mit dem *Site-Directed Spinlabeling* von Proteinen diente in den letzten Jahren zunehmend zur Strukturaufklärung von Proteinen (Berliner *et al.*, 2000; Steinhoff *et al.*, 2000). *Continuous Wave*-EPR-Messungen ermöglichen Aussagen zur Lösungsmittelzugänglichkeit und zur Mobilität von Spinlabeln. Bei mehrfach spinmarkierten Proteinen können Abstände von bis zu 20 Å zwischen benachbarten Spinlabeln detektiert werden. Über gepulste EPR-Messungen wie beispielsweise die *Double Electron Electron Resonance* (DEER)-Spektroskopie können Entfernungen von bis zu 80 Å zwischen Spinlabeln detektiert werden.

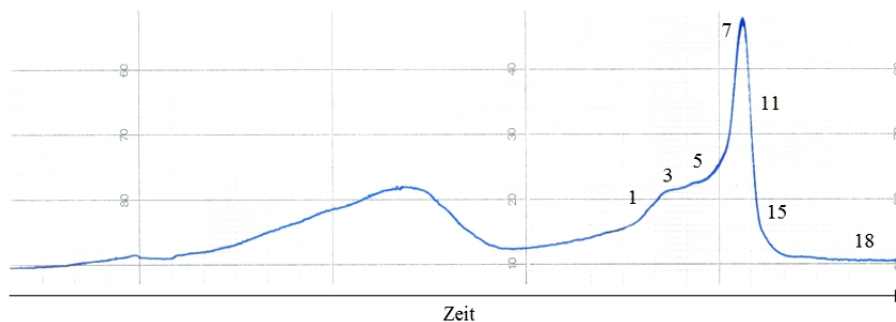
Anknüpfend an die Erkenntnisse vorheriger Untersuchungen, dass es durch die Bindung von entfaltetem BPTI an das SecB Wildtyp-Protein zu einer Konformationsänderung des Chaperons kommt, besteht das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, diese Strukturänderung genauer zu untersuchen. Hierzu müssen verschiedene SecB-Mutanten entworfen, exprimiert und aufgereinigt werden, die pro Monomer nur noch ein für Spinlabelreagenzien gut zugängliches Cystein besitzen. Auf diese Weise wird am SecB-Tetramer die Voraussetzung geschaffen, dass die Spinlabel an definierte Aminosäurepositionen binden, um eindeutige Aussagen bezüglich einer Konformationsänderung machen zu können. Mit Hilfe des *Molecular Modelings* sollen die theoretischen Abstände zwischen den Spinlabeln der SecB-Mutanten bestimmt werden, um bei späteren EPR-Untersuchungen die experimentell ermittelten Distanzen den berechneten Abständen zuordnen zu können.

Weiterhin sollen die Untersuchungen zur Konformationsänderung durch die Bindung des Modellsubstrats BPTI auf ein natürliches Substrat, das Vorläuferprotein des *Maltose-Binding Proteins* (preMBP) ausgeweitet werden. Hierzu muss das Protein zunächst exprimiert und aufgereinigt werden. Nachfolgend müssen geeignete Reaktionsbedingungen ermittelt werden, bei denen es zur Ausbildung des Chaperon-Substrat-Komplexes kommt. Dieser SecB-preMBP-Komplex soll nachgewiesen und EPR-spektroskopisch untersucht werden.

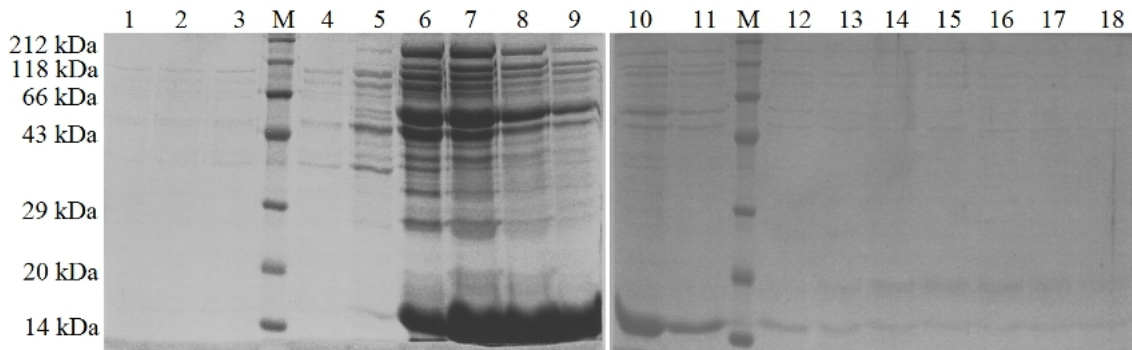
### 3 Eigene Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Expression und Isolierung von SecB mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie

Die Expression und Isolierung aller SecB-Mutanten erfolgte entsprechend der Literatur (Krishnan, 2004), wie in Kap. 5.5 auf Seite 103 im experimentellen Teil beschrieben. SecB wurde in zwei aufeinanderfolgenden säulenchromatographischen Schritten aus dem Zelllysate isoliert. Im ersten Schritt wurde ein Anionentauscher verwendet, im zweiten eine Größenausschlusschromatographie. Aus 750 ml Zellkultur wurden nach einer Dauer von 22,5 Stunden 8,2 g Zellen isoliert. Das nach der Zellyse erhaltene Lysat wurde durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit und zur weiteren Aufreinigung auf eine *fast-flow* Q-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mittels NaCl-Konzentrationsgradienten von 200 – 400 mM. Bei einer NaCl-Konzentration von 200 mM werden zunächst ungebundene Proteine von der Säule gewaschen. Durch die kontinuierliche Erhöhung der NaCl-Konzentration konkurrieren die Chloridionen mit den an das Säulenmaterial gebundenen Proteinen und es findet ein Austausch statt. Die Aufreinigung wurde photometrisch verfolgt und alle Elutionsfraktionen gesammelt. Das Elutionsdiagramm der Aufreinigung mittels *fast-flow* Q-Sepharose-Säule ist in Abbildung 3.1 am Beispiel einer Aufreinigung des SecB WT-Proteins dargestellt.

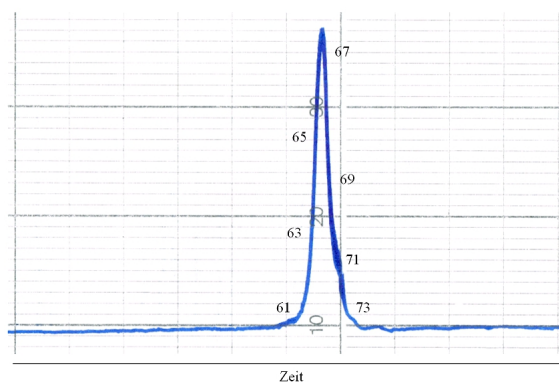


**Abb. 3.1:** Elutionsdiagramm der *fast-flow* Q-Sepharose-Säule mit SecB WT. Die x-Achse zeigt die Elutionszeit, die y-Achse die relative Extinktion. Die Zahlen geben die entnommenen Fraktionen zur Analyse mittels SDS-PAGE wieder. Der erste, flachere Peak zeigt die Elution der ungebundenen Proteine. Durch kontinuierliche Erhöhung der NaCl-Konzentration eluieren nach einiger Zeit die negativ geladenen Proteine, darunter auch SecB.

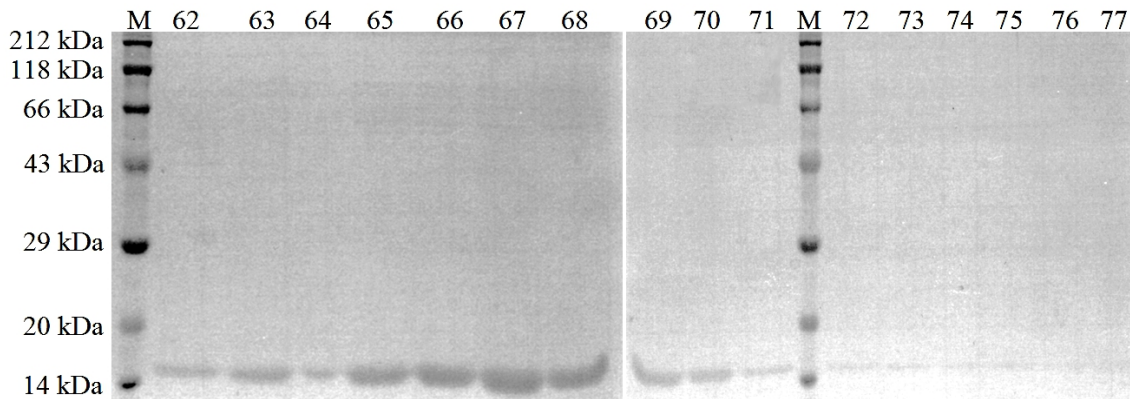


**Abb. 3.2:** 12 %ige SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der *fast-flow* Q-Sepharose-Säule mit SecB WT. M: Marker. Die Zahlen geben die jeweiligen Elutionsfraktionen an.

Neben den monomeren Untereinheiten des SecB WT-Proteins sind auf den SDS-Gelen in Abbildung 3.2 Banden weiterer Proteine sichtbar. Um diese Verunreinigungen abzutrennen, wurden die SecB-haltigen Fraktionen der *fast-flow* Q-Sepharose-Säule vereinigt und auf eine nach dem Größenausschlussprinzip arbeitende Sephacryl-S200 HR-Säule aufgetragen. Das Säulenmaterial trennt Proteine in einem Molekulargewichtsbereich von 5 bis 250 kDa. Durch die Gelfiltration werden größere Proteine vollständig von den Poren des Säulenmaterials ausgeschlossen, haben somit den kürzesten Weg durch die Säule und eluieren folglich zuerst. Kleinere Proteine dringen vollständig in die Poren des Säulenmaterials ein und wandern dadurch langsamer. Das Elutionsdiagramm einer Sephacryl-S200 HR-Säule und die zugehörige SDS-PAGE der Elutionsfraktionen sind in den Abbildungen 3.3 und 3.4 dargestellt.



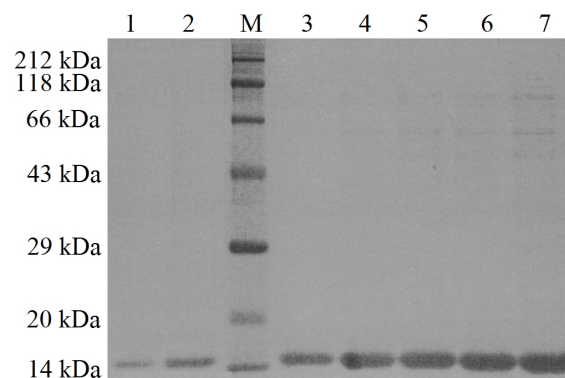
**Abb. 3.3:** Elutionsdiagramm der Sephacryl-S200 HR-Säule mit SecB WT. Die x-Achse zeigt die Elutionszeit, die y-Achse die relative Extinktion. Die Zahlen geben die entnommenen Fraktionen zur Analyse mittels SDS-PAGE wider.



**Abb. 3.4:** 12 %ige SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Sephacryl-S200 HR-Säule mit SecB WT. M: Marker. Die Zahlen geben die jeweiligen Elutionsfraktionen an.

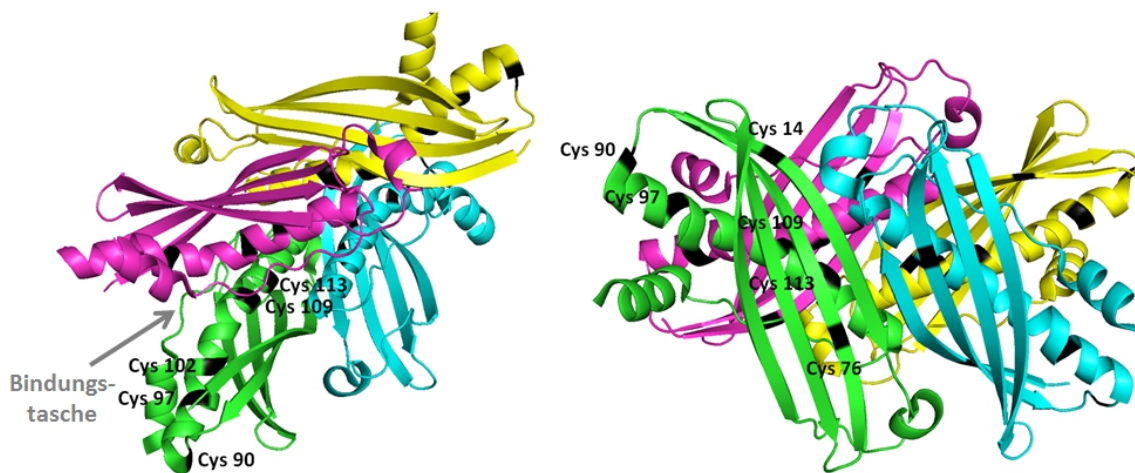
Die beiden SDS-Gele in Abbildung 3.4 zeigen das aufgereinigte SecB-Protein. In den Elutionsfraktionen 67 und 68 wurde mit Hilfe eines Densitometers die Reinheit des SecB WT-Proteins bestimmt. Für die Bande 67 ergab sich ein Wert von 94 % und für die Bande 68 lag die Reinheit bei 95 %.

Alle SecB-haltigen Elutionsfraktionen wurden vereinigt und, wie in Kap. 5.5.2 auf Seite 104 beschrieben, aufkonzentriert. Aus 25 ml Zellysate wurden ungefähr 5,2 mg SecB mit einer Konzentration von ca. 550 µg/ml isoliert. Zur abschließenden Reinheitskontrolle des isolierten SecB-Proteins wurde eine SDS-PAGE mit steigenden Proteinmengen angefertigt (siehe Abb. 3.5). Für die Proteinbanden ergaben sich folgende Reinheiten: Bande 1: 96 %, Bande 2: 98 %, Bande 6: 94 %, Bande 7: 91 %.



**Abb. 3.5:** 12 %ige SDS-PAGE des aufgereinigten SecB WT-Proteins mit steigenden Proteinmengen. M: Marker, Bande 1: 0,548 µg/ml, Bande 2: 1,64 µg/ml, Bande 3: 2,74 µg/ml, Bande 4: 3,84 µg/ml, Bande 5: 5,48 µg/ml, Bande 6: 6,58 µg/ml, Bande 7: 8,22 µg/ml.

Um die im SDS-Gel vorhandene Bande eindeutig als SecB zu identifizieren, wurde eine Gelbande ausgeschnitten und für die massenspektroskopische Analyse aufbereitet (vgl. Kap. 5.10.2 auf Seite 114). Zunächst erfolgte die Entfärbung des SDS-Gels in Gegenwart von Ammoniumhydrogencarbonat und Acetonitril. Im nächsten Schritt wurden die Cysteine mit DTT reduziert und anschließend mit Iodacetamid alkyliert. Hierdurch gelang eine vollständige Entfaltung des Proteins durch das irreversible Spalten der vorhandenen Disulfidbrücken. Durch den anschließenden Trypsinverdau entstanden kleinere Peptide. Mit Hilfe der erhaltenen MALDI-ToF Massenspektren (Abb. A.1 SecB WT und Abb. A.2 SecB E90C auf Seite 128 im Anhang) des tryptischen Verdau konnten die Proteine validiert werden. Die Sequenzabdeckung lag bei 30 % für das Wildtyp-Protein und bei 36 % für die SecB-Mutante E90C.



**Abb. 3.6:** Bändermodell des SecB-Tetramers [Kristallstruktur-Datensatz PDB Code: 1QYN, RCSB PDB (Dekker *et al.*, 2003)]. Die linke Abbildung zeigt eine seitliche Ansicht der aufeinanderliegenden Dimere pink/gelb und grün/blau mit der Substratbindungstasche, die rechte Abbildung eine Draufsicht auf die hintereinander liegenden Dimere. Hervorgehoben sind die für Spinlabel-Modifizierungen relevanten natürlichen Cysteine an den Aminosäurepositionen 76, 97, 102 und 113 sowie alle eingefügten Cysteine an den Positionen 14, 90 und 109.

Die Benennung der einzelnen SecB-Mutanten spiegelt die Veränderungen in der Aminosäuresequenz im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz wider. Der erste Buchstabe steht für die im Wildtyp-Protein vorkommende Aminosäure, die Zahl gibt die Position an und der folgende Buchstabe zeigt die Aminosäure, gegen die erstere in der Mutante getauscht wurde. Bei SecB E90C wurde beispielsweise die Glutaminsäure (E) an Aminosäureposition 90 in allen vier Untereinheiten des Homotetramers in ein Cystein mutiert. Weiterhin wurden die natürlichen Cysteine an den Positionen 76, 97 und 102 durch Alanine (A) ersetzt. Frühere Untersuchungen von Krishnan (Krishnan *et al.*, 2009) zeigten, dass



die Aminosäureposition 90 eine exponierte und für Spinlabel oder Fluoreszenzlabel sehr leicht zugängliche Stelle an der Peripherie des Proteins darstellt (vgl. Abb. 3.6). Deshalb war diese Mutante besonders interessant für spätere Konformationsuntersuchungen mittels EPR-Spektroskopie.

## 3.2 Umklonierung der SecB-Gene in pET20b(+)

Die SecB-Vektoren wurden uns ursprünglich von R. Varadarajan vom Indian Institute of Science in Bangalore/Indien zur Verfügung gestellt. Das SecB E90C-Gen lag in einem pET9a-Vektor mit Kanamycin-Resistenz vor, der Vektor mit SecB WT besaß eine Ampicillin-Resistenz. Weiterhin war bekannt, dass die SecB-Gene alle über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *PstI* in die entsprechenden Vektoren inkloniert wurden.

Die Isolierung und Aufreinigung von SecB erfolgte bisher durch zwei aufeinanderfolgende säulenchromatographische Schritte, eine Anionentauscher- und eine Größenausschlusschromatographie. Um diese aufwändige Prozedur zu vereinfachen und die Ausbeute an SecB zu steigern, wurden die einzelnen SecB-Gene aus den ursprünglichen Vektoren in einen neuen Vektor mit 6x His-Tag umkloniert. Der His-Tag ermöglichte später die Aufreinigung des Proteins mit Hilfe einer Nickel-Affinitätschromatographie. Hierzu wurden jeweils zwei synthetische Oligonukleotide verwendet und im Zuge der Umklonierung zusätzlich eine Thrombinschnittstelle sowie eine *XhoI*- und *NdeI*-Restriktionsschnittstelle an die jeweiligen SecB-Gene angefügt. Die Thrombinschnittstelle diente später zur Abspaltung des His-Tags und die beiden Restriktionsschnittstellen ermöglichten das Einklonieren in den pET20b(+)-Vektor. Der käuflich erworbene Vektor bestand aus 3716 bp, besaß eine Ampicillin-Resistenz sowie einen C-terminalen 6x His-Tag (vgl. Abb. A.3 auf Seite 129 im Anhang).

### 3.2.1 Primerdesign

Die erforderlichen Oligonukleotidprimer wurden mit Hilfe des Programms *Clone Manager Suite 7* entworfen und sind in den Abbildungen 3.7 und 3.8 dargestellt. Sie verfügten über einen geeigneten GC-Gehalt sowie über eine ausreichende Überlappung mit der SecB-Matrize. Der Gehalt des Primers an den Basen Guanin und Cytosin ist neben der Primerlänge entscheidend für die Schmelztemperatur. Zwischen den Basen Guanin und

Cytosin befinden sich drei Wasserstoffbrücken, zwischen Adenin und Thymin hingegen nur zwei. Eine zu niedrige Schmelztemperatur führt während der PCR zu falsch positiven Ergebnissen, da es vermehrt zu unspezifischen Primeranlagerungen kommt. Mit steigendem GC-Gehalt nimmt zwar auch die Stabilität des Primers zu, jedoch auch seine Schmelztemperatur. Eine zu hohe Schmelztemperatur führt zu einer geringeren Produktkonzentration, da die Primeranlagerung während der Hybridisierung nicht mehr ausreichend stattfinden kann.

An das jeweilige 5'-Ende der beiden Primer wurden vier Schutzbasen „CACCC“ angehängt, die als Angriffspunkt für die Restriktionsendonuklease *NdeI* im Falle des *SecBforward*-Primers bzw. für *XhoI* im Falle des *SecBreverse*-Primers dienen.



**Abb. 3.7:** Nukleotidsequenz des *SecBforward*-Primers. Er umfasst vier Schutzbasen, eine *NdeI*-Schnittstelle sowie den Beginn des *SecB*-Gens.

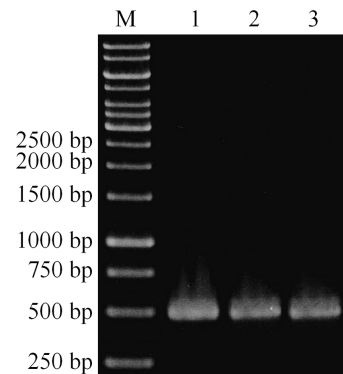


**Abb. 3.8:** Nukleotidsequenz des *SecBreverse*-Primers. Er umfasst vier Schutzbasen, eine *XhoI*-Schnittstelle, die Thrombinschnittstelle sowie das Sequenzende des *SecB*-Gens.

### 3.2.2 Amplifizierung der *SecB*-Gene

Zur Vervielfältigung der jeweiligen *SecB*-Gene wurden in einem ersten Schritt Glycerinkulturen mit den entsprechenden Ursprungsplasmiden auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde von den gewachsenen Kolonien jeweils eine entnommen und damit eine 20 ml Flüssigkultur angeimpft. Nach erneuter Inkubation über Nacht bei 37 °C erfolgte schließlich am dritten Tag die Isolierung der Plasmide (vgl. Kap. 5.3.2.1 auf Seite 96). Mit Hilfe der oben dargestellten *SecB*-Primer gelang die Amplifizierung der jeweiligen *SecB*-Gene aus den Ursprungsvektoren mittels PCR (siehe Kap. 5.3.3 auf Seite 96). Das Ergebnis der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

**Abb. 3.9:** 1,2 %iges Agarosegel der PCR mit *SecBforward*-Primer und *SecBreverse*-Primer zur Amplifizierung der *SecB*-Gene *SecB* WT, *SecB* E90C und *SecB* Q14C aus den ursprünglichen Vektoren. M: Marker, Bahn 1: *SecB* WT, Bahn 2: *SecB* E90C, Bahn 3: *SecB* Q14C.



Bei allen drei Mutanten war die Amplifizierung mit den entworfenen Primern erfolgreich verlaufen. Die *SecB*-Gene mit einer Länge von nun jeweils ca. 500 bp konnten aus den ursprünglichen Vektoren herauskloniert werden. Die amplifizierte Sequenz enthielt die 468 bp lange *SecB*-Sequenz, die über die beiden Primer einklonierten Restriktionsschnittstellen *NdeI* bzw. *XhoI* sowie die Thrombinschnittstelle. Die Gesamtlänge des PCR-Produkts lag bei 508 bp. Mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kit erfolgte die Aufreinigung des PCR-Ansatzes, um das gewünschte PCR-Produkt von der Template-DNA, den Primern sowie der DNA-Polymerase zu trennen. Die DNA-Konzentration wurde anschließend für die nachfolgenden Arbeitsschritte photometrisch (siehe Kap. 5.3.2.3 auf Seite 96) ermittelt.

### 3.2.3 Charakterisierung und Ligation der *SecB*-Gene

Vor der Einklonierung des aufgereinigten PCR-Produkts in den neuen Vektor pET20b(+) wurde dieses zunächst durch Sequenzierung charakterisiert. Die Sequenzierung wurde am Institut für Immunologie und Genetik am Westfalzklinikum in Kaiserslautern mit den *SecBforward*- und *SecBreverse*-Primern durchgeführt. Das Sequenzierergebnis bestätigte die erfolgreiche Modifizierung der jeweiligen *SecB*-Gene. Alle *SecB*-Gene verfügten nun über eine Thrombinschnittstelle sowie die beiden Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* (Ergebnisse nicht dargestellt). Alle Mutationen im *SecB*-Gen konnten eindeutig durch den Abgleich mit der NCBI-Datenbank verifiziert werden.

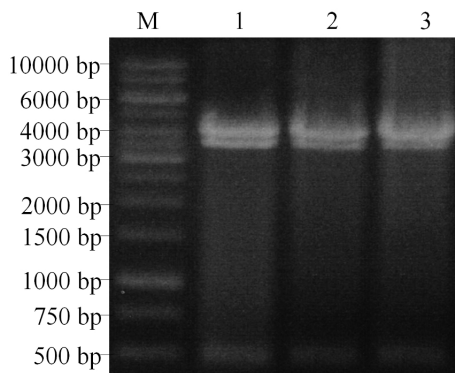
Die Einklonierung der entsprechenden *SecB*-Gene in den Vektor pET20b(+) erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in die *Multi Cloning Site*. Zur Vorbereitung auf die Ligation wurden sowohl die *SecB*-Gene als auch der Vektor pET20b(+) mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* verdaut. Hierdurch wurde der Expressionsvek-

tor an den zur Einklonierung notwendigen Stellen geöffnet. Weiterhin wurden durch den Verdau der SecB-Gene die sich am 5'-Ende noch befindlichen Schutzbasen abgespalten und dadurch die erforderlichen *Sticky Ends* erzeugt. Die verdauten SecB-Gene und der pET20b(+)-Vektor wurden anschließend mittels QIAquick Purification Kit aufgereinigt (vgl. Kap. 5.3.8 auf Seite 99), um DNA-Reste und Enzyme zu entfernen.

Der geschnittene pET-Vektor hatte nun eine Größe von 3588 bp und die jeweiligen SecB-Gene waren 494 bp lang. Bei der anschließenden Ligation wurde die doppelte Menge Insert im Vergleich zum Vektor eingesetzt (vgl. Kap. 5.3.6 auf Seite 98). Verwendet wurden 50 ng Vektor und jeweils 100 ng Insert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C. Am Folgetag wurden nach der Inaktivierung der Ligase die Ligationsansätze in ultrakompetente XL1-Blue-Zellen transformiert (vgl. Kap. 5.3.9 auf Seite 99) und auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Auf allen Agarplatten waren Kolonien gewachsen. Der *E. coli*-Stamm XL1-Blue ist besonders zur Vervielfältigung von DNA geeignet, da er niedrige Rekombinationsraten und Endonukleaseaktivität besitzt, was zur besseren Stabilität des DNA-Inserts beiträgt.

### 3.2.4 Kontrollverdau und Charakterisierung der SecB-Expressionsvektoren

Ausgehend von den transformierten Zellen auf den über Nacht inkubierten Agarplatten wurden Flüssigkulturen angelegt. Aus den gewachsenen Zellen wurde für eine Charakterisierung die Vektor-DNA isoliert. Nachfolgend wurde zur Kontrolle ein Doppelverdau der isolierten pET20b(+)-Vektoren mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* durchgeführt. Das Ergebnis der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese ist in Abbildung 3.10 dargestellt.



**Abb. 3.10:** 1,2 %iges Agarosegel des Doppelverdaus von pET20b(+) mit den jeweiligen SecB-Genen mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI*. M: Marker, Bahn 1: pET20b(+) mit SecB WT, Bahn 2: pET20b(+) mit SecB E90C; Bahn 3: pET20b(+) mit SecB Q14C.

Das Agarosegel zeigt für alle drei SecB-Gene eine erfolgreiche Ligation in den Vektor pET20b(+). Die jeweiligen Inserts haben eine Größe von 494 bp und der geöffnete Vektor ist 3588 bp lang. Im oberen Teil des Agarosegels sind Doppelbanden bei ca. 3500 und 4000 bp vorhanden, die auf einen unvollständigen Restriktionsverdau hindeuten. Die Bande bei 4000 bp lässt vermuten, dass der Vektor nur von einem der beiden Restriktionsenzyme geschnitten wurde und sich somit eine Größe von 4082 bp für den linearisierten Vektor ergibt. Wurde der Vektor von beiden Restriktionsendonukleasen verdaut, reduziert sich seine Größe um das SecB-Gen, welches 494 bp lang ist. Dadurch ergibt sich eine Vektorlänge von 3588 bp, was die Bande bei ca. 3500 bp erklärt.

Um sicherzustellen, dass die Einklonierung fehlerfrei verlaufen war und die SecB-Gene keine Mutationen trugen, wurden alle pET20b(+)-Vektoren mit den jeweiligen SecB-Genen sequenziert. Verwendet wurden T7forward- und T7reverse-Primer. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten SecB-Primern liegen die Bindungsstellen der beiden T7-Primer vor und hinter dem inklonierten SecB-Insert. Auf diese Weise sollte die Sequenzierung einerseits die korrekte Basensequenz der SecB-Gene bestätigen und andererseits die korrekte Lage der SecB-Gene im Vektor verifizieren. Alle Sequenzierungen lieferten fehlerfreie Ergebnisse und sind im Anhang dargestellt (vgl. Abb. A.6 auf Seite 131, Abb. A.7 auf Seite 132 und Abb. A.8 auf Seite 133).

### 3.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Das natürliche SecB-Protein enthält vier Cysteine an den Aminosäurepositionen 76, 97, 102 und 113 (Dekker *et al.*, 2003). Um Untersuchungen über die Substratbindung am SecB-Protein durchzuführen, wurden nachfolgend durch ortsgerechte Mutagenese einzelne Cysteine eingefügt bzw. entfernt, um bei späteren Abstandsmessungen Aussagen darüber treffen zu können, an welchem Cystein das Spinlabel gebunden ist. Die Mutante SecB E90C besitzt im Vergleich zum Wildtyp noch ein zusätzliches Cystein an der Aminosäureposition 90, welches aufgrund seiner exponierten Lage sehr gut für Spinlabelreagenzien zugänglich sein sollte. Die Mutante SecB C97 besitzt noch ein einzelnes Cystein an der Position 97, die drei anderen natürlichen Cysteine sind durch Alanine ersetzt. Von den insgesamt vier im Wildtyp vorkommenden Cysteinen reagieren die Reste an den Positionen 97 und 102 wesentlich schneller mit Spinlabelreagenzien als die Reste 76 und 113 (Panse *et al.*, 2001).

Da vorherige EPR-Untersuchungen an der Position 97 eine signifikante Konformationsänderung nach der Substratbindung zeigten (Haimann *et al.*, 2011) und die Vermutung nahelegen, dass es im Bereich der von Xu *et al.* beschriebenen Substratbindungstasche (Xu *et al.*, 2000) (vgl. Abb. 3.6 auf Seite 33) zwischen den beiden Dimeren zu einer Aufweitung des gesamten Chaperons kommt, sollten nun Abstandsmessungen zwischen weiteren Aminosäurepositionen tiefer in der Bindungstasche durchgeführt werden. Hierzu wurden mittels *Molecular Modeling* die zwei Positionen 109 und 113 bestimmt, da diese ins Innere der Bindungstasche zeigen und somit gut für Spinlabelreagenzien zugänglich sein sollten. Die mittels *Molecular Modeling* bestimmten mittleren Abstände zwischen den jeweiligen Aminosäuren der gegenüberliegenden Untereinheiten A und C betragen für die Aminosäureposition 109 11,9 Å bzw. für die Untereinheiten B und D 12,7 Å. Für die Mutante SecB C113 liegen die Abstände der Cysteine zwischen den Untereinheiten A und C sowie B und D jeweils bei 13,2 Å (vgl. Tab. 3.3 auf Seite 65 sowie Abb. 3.40 auf Seite 65).

Ausgehend von der im Arbeitskreis zwischenzeitlich generierten Mutante SecB C97, die in allen vier Untereinheiten nur noch ein natürliches Cystein an der Aminosäureposition 97 enthält (die natürlichen Cysteine an den Positionen 76, 102 und 113 wurden jeweils durch Alanin ersetzt), wurden die beiden Mutanten SecB C109 und SecB C113 generiert. Hierzu wurde mit Hilfe der in Abschnitt 5.3.12 auf Seite 100 dargestellten Oligonukleotidprimer zunächst das Cystein an Aminosäureposition 97 durch Alanin ersetzt und in einem zweiten Schritt die Aminosäure an der gewünschten Position in ein Cystein mutiert. Die verwendeten Oligonukleotidprimer besaßen jeweils mittig die notwendigen Basenaustausche, die in der folgenden Tabelle dargestellt sind. Abbildung 3.11 zeigt einen grafischen Vergleich der Nukleotidsequenz des Wildtyps mit der SecB-Mutante C97.

**Tab. 3.1:** Eingefügte Punktmutationen in die Mutante SecB C97 zur Herstellung weiterer Mutanten, die nur noch ein Cystein in jeder Untereinheit besitzen. Dargestellt sind die jeweiligen Basentriplets des SecB WT-Gens und die jeweils translatierte Aminosäure sowie die mutierten Basentriplets und die dadurch neu translatierte Aminosäure.

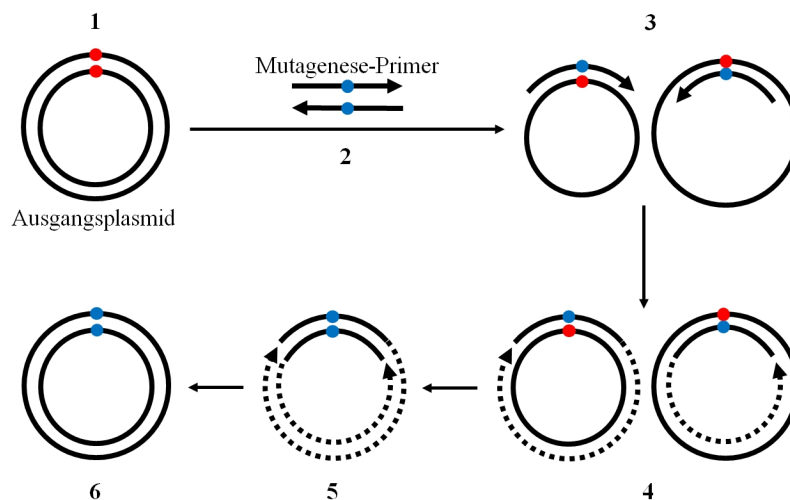
Position	ursprüngliches Codon	translatierte Aminosäure		mutiertes Codon	translatierte Aminosäure
97	tgc	Cystein	⇒	gcc	Alanin
109	tat	Tyrosin	⇒	tgc	Cystein
113	gcc	Alanin	⇒	tgc	Cystein

SecB C97	1	tgtttaactttaagaaggagatatacatatggtcagaacaaaacaacactgaaatgacttt	Start SecB
SecB WT	683	.....	
SecB C97	61	ccagatccaacgtatattataccaaggatatctctttcgaagcgccgaacgcgcccacgt	
SecB WT	623	.....	
SecB C97	121	tttccagaaagattggcaaccagaagttaaacttgatctggatacggcatcttcccaact	
SecB WT	563	.....	
SecB C97	181	ggcagatgacgtatacgaagtggactcgtgttaccgtaacggcctctttgggcaaga	
SecB WT	503	.....	
SecB C97	241	aaccgcggttctcgtggaagtgcagcagggcggtatatttctccatcgccgggtatcgaagg	AS 76
SecB WT	443	.....	
SecB C97	301	caccagatggcgcatctgctgggagcatacggcccgaaacattctgttcccgtatgctcg	AS 102
SecB WT	383	.....	
SecB C97	361	tgaggccatcaccagcatggtatcccgcggtacattcccgaactgaaacctgcgccggt	AS 113
SecB WT	323	.....	
SecB C97	421	taacttcgatgcgctgttcataactatttgcagcagcaggctggcgaaggactgaaga	
SecB WT	263	.....	
SecB C97	481	acatcaggatgcccagcagcggcctgtgtgccgcgcccagcctcgagcaccaccaccacca	Ende SecB
SecB WT	203	.....	Thrombin-Schnittstelle
SecB C97	541	ccactgagatccggctgctaacaaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgc	6x His-Tag
SecB WT	143	.....	
SecB C97	601	tgagcaataactagcataacccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttggct	Stopp-Codon
SecB WT	83	.....	
SecB C97	661	gaaaggaggaactatatccgat	T7 Terminator Primer
SecB WT	23	.....	

**Abb. 3.11:** Nukleotidsequenzvergleich der Mutante SecB C97 mit der SecB WT-Sequenz. Die eingefügten Mutationen sowie alle Charakteristika sind farblich markiert.

Die ortsgerichtete Mutagenese erfolgte entsprechend der Anleitung in Kap. 5.3.10 auf Seite 100 und ist in Abbildung 3.12 schematisch dargestellt. Ausgehend vom pET20b(+)-Vektor, der das SecB C97-Gen enthält (rote Markierung), wurden in der anschließend durchgeführten PCR (Schritt 2) die jeweiligen Mutagenese-Primer zugegeben. Diese enthalten jeweils in der Mitte die gewünschte Punktmutation (blaue Markierung). Beim nach der Denaturierung erfolgenden Annealing (Schritt 3) lagern sich die Primer an die SecB-Gensequenz an. Die DNA-Polymerase verlängert die beiden Primer, so dass schließlich zwei offene DNA-Stränge mit der entsprechenden Mutation entstehen (Schritt 4). Durch den Verdau der parentalen, unmutierten DNA mit Hilfe der Endonuklease *DpnI* (Schritt 5) wird der Erhalt des Vektors mit der mutierten Gensequenz gewährleistet. Der bisher immer noch offene Vektor wurde in ultrakompetente XL1-Blue Zellen transformiert, die feh-

lende Phosphodiesterbindung von den DNA-Polymerasen der Zellen geknüpft (Schritt 6) und das Plasmid vermehrt. Das Plasmid wurde anschließend aus den transformierten Zellen isoliert und diente als Ausgangspunkt für die folgenden Mutageneseschritte. Der Vektor enthielt nun die Gensequenz einer SecB-Mutante ohne Cysteine. Im folgenden Schritt sollten an den Aminosäureposition 109 bzw. 113 die entsprechenden Aminosäuren in ein Cystein mutiert werden, um die SecB-Mutanten SecB C109 bzw. SecB C113 zu erzeugen.



**Abb. 3.12:** Schematischer Ablauf der ortsgerichteten Mutagenese. 1: Isoliertes Ausgangsplasmid, 2: PCR mit den jeweiligen Mutagenese-Primern, 3: Denaturierung der Plasmide und Primer-Annealing, 4: Primerverlängerung mittels DNA-Polymerase, 5: Verdau der nicht mutierten, methylierten DNA mit *DpnI*, 6: Plasmid mit entsprechender Punktmutation.

Zur Überprüfung der jeweiligen Mutationsschritte erfolgte eine Sequenzanalyse des entsprechenden DNA-Abschnitts mit *T7forward* und *T7reverse*-Primern. In Abbildung 3.13 ist das Sequenzierergebnis des ersten Mutageneseschritts dargestellt, bei dem zunächst eine cysteinfreie Mutante hergestellt wurde. Das abschließende Sequenzierergebnis für die neu generierten Mutanten SecB C109 und SecB C113 zeigt, dass alle vorgenommenen Mutationen erfolgreich in das SecB-Gen eingefügt wurden. Das Ergebnis der Sequenzierungen ist in den Abbildungen A.9 auf Seite 134 und A.10 auf Seite 135 im Anhang dargestellt.



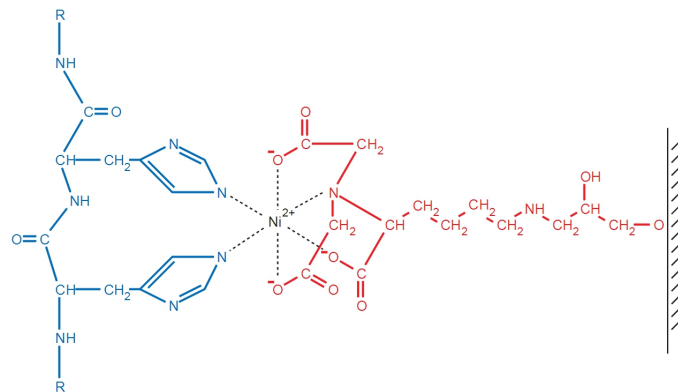
SecB Cysfrei	1	tg	tttaactttaagaaggagatatacat	atgtcagaacaaaacaactgaaatgacttt	Start SecB	
SecB C97	23	.....	.....	.....		
SecB Cysfrei	61	ccagatccaacgtatttataccaaggatattctctttcgaagcgccgaacgcgccgcacgt				
SecB C97	83	.....	.....	.....		
SecB Cysfrei	121	tttcagaaagattggcaaccagaagttaaacttgatctggatacggcatcttccaact				
SecB C97	143	.....	.....	.....		
SecB Cysfrei	181	ggcagatgacgtatacgaagtggactgctgtttaccgtaacggcctctttgggccaaga				
SecB C97	203	.....	.....	.....		
SecB Cysfrei	241	aaccgcttctctg	gctgaagttcagcagggcggtat	tttctccatcgcgggtatcgaagg	AS 76	
SecB C97	263	.....	.....	.....		
SecB Cysfrei	301	caccagatggcgc	atg	ccctgggagcatac	gcccgaacattctgttcccgtatgctcg	AS 97 AS 102
SecB C97	323	.....	.....	.....		
SecB Cysfrei	361	tgag	gccatcaccagcatgggtatcccgcgggtacattcccgaactgaaccttgcccggt		AS 113	
SecB C97	383	.....	.....	.....		
SecB Cysfrei	421	taacttcgatg	cgctgttcatgaactat	ttgacagcagcaggctggcgaagggtactgaaga		
SecB C97	443	.....	.....	.....		
SecB Cysfrei	481	acatcaggatg	ccagcagcggtcgggtgccgcg	ggcagdcctcgagcaccaccaccacca	Ende SecB Thrombin-Schnittstelle 6x His-Tag	
SecB C97	503	.....	.....	.....		
SecB Cysfrei	541	ccactgagatccggctg	taacaaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgc			
SecB C97	563	.....	.....	.....		
SecB Cysfrei	601	tgagcaataactagc	ataacccttggggcctctaaacgggtcttgaggggtttttgct		Stopp-Codon	
SecB C97	623	.....	.....	.....		
					T7 Terminator Primer	

Abb. 3.13: Nukleotidsequenzvergleich der cysteinfreien SecB-Mutante SecB Cysfrei im Vergleich zur SecB C97-Mutante. Die eingefügte Mutation sowie alle Charakteristika sind farblich markiert.

### 3.4 Expression und Isolierung von SecB mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Bisher erfolgte die Aufreinigung von SecB aus dem Zellysate durch zwei aufeinanderfolgende säulenchromatographische Schritte. Dies war mit einem hohen Zeitaufwand verbunden und brachte eher geringe Ausbeuten. Durch die in Kap. 3.2 auf Seite 34 beschriebene Einklonierung eines His-Tags an das SecB-Gen konnte die Aufreinigung ab sofort in einem einzigen Aufreinigungsschritt mittels Nickel-Affinitätschromatographie erfolgen. Hierbei wurde Sepharose CL-6B als Trägermaterial verwendet, an das Nitrilotri-

sigsäure (NTA) gebunden war. NTA dient als Chelatbildner für Nickel-Ionen. Über zwei freie Ligandenbindungsstellen treten die SecB-Proteine mit den Nickel-Ionen in Wechselwirkung und können auf diese Weise in hoher Reinheit aus dem Zelllysate isoliert werden (vgl. Abb. 3.14).



**Abb. 3.14:** Funktionsweise einer Nickel-NTA-Affinitätschromatographie. Als Trägermaterial dient Sepharose CL-6B (schwarz), an welche Nitrilotriessigsäure (NTA, rot) gebunden ist und als Chelatbildner für Nickel-Ionen dient. Die Nickel-Ionen treten mit dem His-Tag des SecB-Proteins (blau) in Wechselwirkung (Qiagen, 2003).

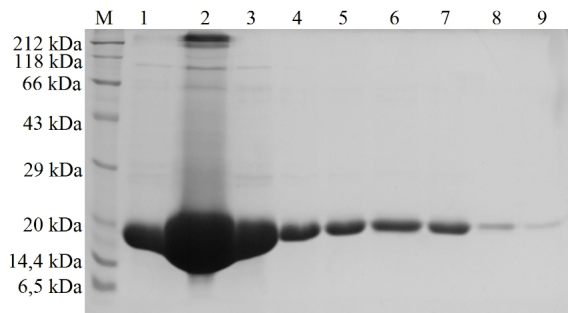
Die pET20b(+)-Vektoren mit der entsprechenden SecB-Gensequenz wurden in ultrakompetente *E. coli* KRX-Zellen transformiert (siehe Kap. 5.3.9 auf Seite 99) und nach Anleitung in Kap. 5.5 auf Seite 103 exprimiert. Dieser Bakterienstamm eignet sich besonders gut zur Proteinexpression, da die Proteolyse überexprimierter Proteine durch die Mutationen  $\Delta ompP$  und  $\Delta ompT$  reduziert sind. Weiterhin unterliegt die Genexpression dem Rhamnose-Promotor sowie dem T7-RNA-Polymerase-Gen. Der Promotor kann durch Zugabe von Rhamnose kontrolliert aktiviert werden, wobei Rhamnose selbst aufgrund einer Deletion der entsprechenden Rhamnose-Gene nicht metabolisiert werden kann (Hartnett *et al.*, 2006; Litterer und Schagat, 2007; Schagat *et al.*, 2008).

Nach dem Zentrifugieren der über Nacht gewachsenen Zellkultur und dem Waschen des Zellpellets zur Entfernung von Nährmediumrückständen erfolgte die Zellyse mittels Ultraschall. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation von den löslichen Proteinen getrennt. Durch anschließende Ultrazentrifugation gelang die Entfernung von Schwebstoffen. Die Isolierung der jeweiligen SecB-Proteine aus dem Zelllysate erfolgte durch Affinitätschromatographie mit Hilfe von Nickel-NTA-Agarose wie in Kap. 5.5.2.3 auf Seite 105 dargestellt.

Die Nickel-Affinitätschromatographie wurde sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Unter nativen Bedingungen besteht die Gefahr, dass vermehrt Proteine ohne His-Tag über vorhandene Histidinreste mit den Nickel-Ionen des Säulenmaterials wechselwirken. In Anwesenheit eines denaturierenden Stoffes entfaltet sich das Chaperon, der His-Tag ist folglich besser zugänglich und kann dadurch effizienter mit den Nickel-Ionen in Kontakt treten. Die Bindungsaffinität des His-Tags zum Säulenmaterial ist somit höher, wodurch die Bindung von ungewünschten Proteinen ohne His-Tag abnimmt und das Chaperon in höherer Reinheit aufgereinigt werden kann. Im Folgenden sind beide Aufreinigungen dargestellt, da zu diesem Zeitpunkt unklar war, ob für das *Site-Directed Spinlabeling* eine Teilentfaltung der Mutante SecB C113 bzw. C109 erforderlich ist, da die Cysteine tiefer in der Bindungstasche liegen als bei den Mutanten SecB C97 bzw. E90C. Die Mutanten SecB C97 und SecB E90C wurden daher unter nativen Bedingungen aufgereinigt, da sich hier bereits gezeigt hatte, dass diese Cysteine eine gute Zugänglichkeit für Spinlabelreagenzien besitzen.

### 3.4.1 Aufreinigung unter nativen Bedingungen

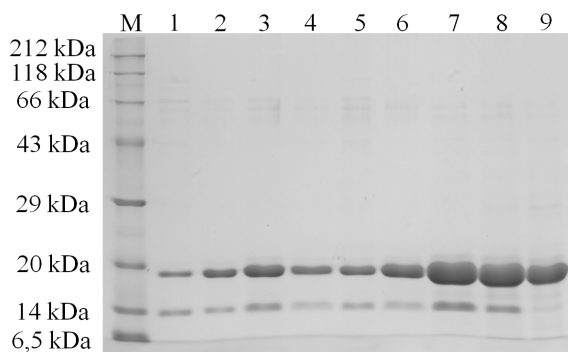
Alle nicht- oder unspezifisch gebundenen Proteine wurden bei niedriger Imidazolkonzentration von 20 mM von der Säule gewaschen. Bei einer solch niedrigen Konzentration werden lediglich leichtere Wechselwirkungen von unspezifisch gebundenen Proteinen gestört, so dass diese von der Säule entfernt werden können, während das SecB-Protein mit seinem 6x His-Tag weiterhin am Säulenmaterial gebunden bleibt. Unspezifische Bindungen an die Nickel-Ionen sind beispielsweise bei Proteinen mit gut exponierten Histidinresten möglich. Ab einer Imidazolkonzentration von 500 mM ist die Affinität von Imidazol gegenüber den Nickel-Ionen des Säulenmaterials höher. Somit verdrängt das Imidazol den His-Tag von den Bindungsstellen des Säulenmaterials, was auf die strukturelle Verwandtschaft von Histidin und Imidazol (der Imidazolring ist Teil der Histidinstruktur) zurückzuführen ist. Dadurch eluiert das SecB-Protein von der Säule. Die SDS-PAGE in Abbildung 3.15 zeigt das überexprimierte, denaturierte SecB deutlich als monomere Untereinheit mit 17,2 kDa in den Elutionsfraktionen der Nickel-NTA-Agarose-Säule.



**Abb. 3.15:** 12 %ige SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Nickel-NTA-Agarose-Säule mit SecB C97 unter nativen Bedingungen. M: Marker. Die Zahlen geben die jeweiligen Elutionsfraktionen an. Das aufgereinigte Protein ist als Monomer bei 17,2 kDa detektierbar.

### 3.4.2 Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen erfolgte bei SecB C113 und SecB C109 wie in Kap. 5.5.2.4 auf Seite 106 beschrieben in Anwesenheit von 1 M Harnstoff. Im Gegensatz zur nativen Methode wurde dem Wasch- und Elutionspuffer kein Imidazol zugefügt, sondern die Puffer enthielten 1 M Harnstoff. Unspezifisch gebundene Proteine wurden hierbei nicht durch die Wechselwirkung von Imidazol mit den Nickel-Ionen von der Säule entfernt, sondern durch Absenken des pH-Werts auf 6,3. Die Histidinreste besitzen einen  $pK_a$ -Wert von 6,0, d.h sie liegen in protonierter Form vor, wenn der pH-Wert während der Elution auf 5,9 bzw. 4,5 abgesenkt wird. Somit wird eine Wechselwirkung des His-Tags mit den Nickel-Ionen unmöglich und SecB eluiert von der Säule. Laut Herstellerangaben eluieren Monomere bei einem pH-Wert von 5,9, Multimere bei einem pH-Wert von ca. 4,5. Zusätzlich war eine geringe Konzentration Harnstoff im Puffer vorhanden, der zur teilweisen Denaturierung des Chaperons diente. Die anschließende Charakterisierung der Elutionsfraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und ist für die Mutante SecB C113 in Abbildung 3.16 dargestellt.

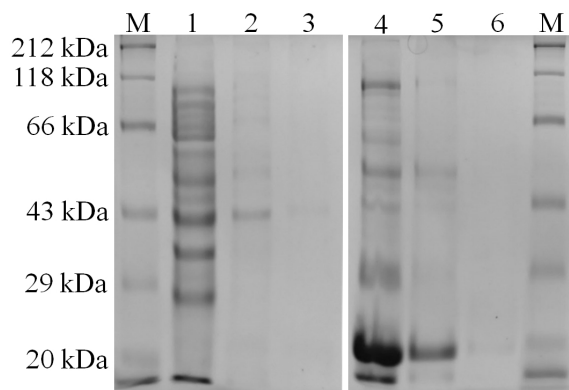


**Abb. 3.16:** 12 %ige SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Nickel-NTA-Agarose-Säule mit SecB C113 unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 1 M Harnstoff. M: Marker. Die Zahlen geben die jeweiligen Elutionsfraktionen an. Bahnen 2 – 5 Elution mit einem pH-Wert von 5,9; Bahnen 6 – 9 Elution mit einem pH-Wert von 4,5.

Die SDS-PAGE zeigt in den Bahnen 2 – 5 die Fraktionen, die mit einem pH-Wert von 5,9 eluiert wurden. Laut Herstellerangaben sollen bei diesem pH-Wert hauptsächlich monomere Proteine eluieren. Die Bahnen 6 – 9 enthalten die Elutionsfraktionen bei einem pH-Wert des Elutionspuffers von 4,5. Hier sollen hauptsächlich Multimere zu sehen sein. Es sind jedoch in allen Fraktionen Proteinbanden knapp unterhalb von 20 kDa zu sehen. Erwartungsgemäß eluierte der größte Anteil an SecB während der zweiten Elution, da das Chaperon unter schwach denaturierenden Bedingungen als Tetramer vorliegt. Die SDS-PAGE zeigt eine zusätzliche Proteinbande bei ca. 14 kDa, die nicht weiter charakterisiert wurde. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Proteine, die aufgrund exponierter Histidinreste ebenfalls mit dem Säulenmaterial wechselwirkten und während des Waschvorgangs nicht von der Säule entfernt werden konnten. Da unter denaturierenden Bedingungen kein Imidazol im Wasch- und Elutionspuffer vorhanden war, konnte das aufgereinigte SecB direkt für die Thrombinspaltung eingesetzt werden und der Dialyseschritt entfiel.

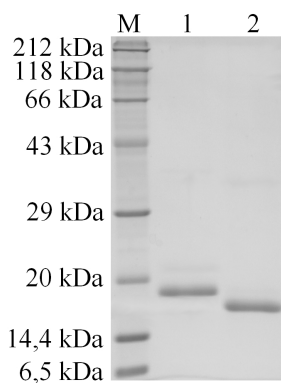
Die SDS-PAGE des mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigten SecB C109-Proteins ist in Abbildung 3.17 dargestellt. In den auf den Bahnen 4 – 6 dargestellten Elutionsfraktionen ist zwar das SecB-Monomer zu sehen, jedoch auch viele Verunreinigungen. Da die Aufreinigung der Mutante SecB C113 mit höherer Reinheit gelang, wurde entschieden, zunächst mit dieser Mutante weiterzuarbeiten. Die Aufreinigung von SecB C109 wurde aus Zeitgründen in Rahmen dieser Arbeit nicht weiter optimiert.

**Abb. 3.17:** 12 %ige SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Nickel-NTA-Agarose-Säule mit SecB C109 unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 1 M Harnstoff. M: Marker. Die Zahlen geben die jeweiligen Elutionsfraktionen an. Bahnen 1 – 3 Elution mit einem pH-Wert von 5,9; Bahnen 4 – 6 Elution mit einem pH-Wert von 4,5.



### 3.4.3 Thrombinspaltung

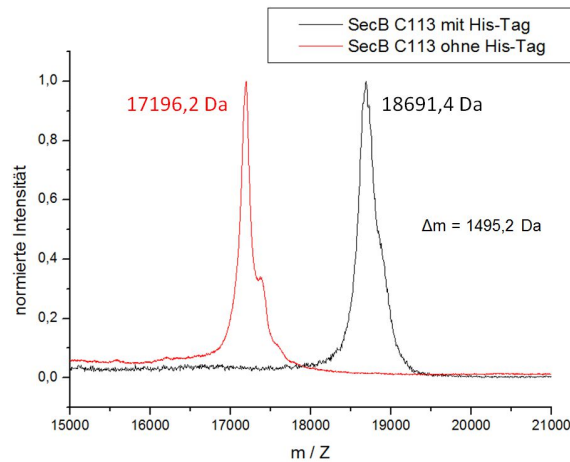
Alle SecB-haltigen Elutionsfraktionen wurden vereinigt und zur Entfernung des Imidazols, welches für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen notwendig war, dialysiert (vgl. Kap. 5.5.2.5 auf Seite 106). Der noch am SecB-Protein gebundene 6x His-Tag wurde anschließend mit Hilfe der Serinprotease Thrombin abgespalten (vgl. Kap. 5.5.2.6 auf Seite 107). Das Enzym erkennt die Aminosäuresequenz LeuValProArg↓GlySer und spaltet zwischen dem SecB-Protein und dem 6x His-Tag die Peptidbindung N-terminal des Glycin-Rests. Um im Anschluss das 36 kDa große Thrombin sowie den abgespaltenen His-Tag vom SecB-Protein zu trennen, wurde der gesamte Reaktionsansatz mehrfach mit Dialysepuffer in einem 50 kDa-Konzentrator aufkonzentriert. Durch die Zentrifugation gelang es, den abgespaltenen His-Tag sowie das Thrombin vom 68,8 kDa großen SecB-Tetramer zu trennen. Die Membran des Konzentrators hält das SecB-Protein zurück, während der His-Tag und das Enzym die Membranporen passieren können. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die Proteinlösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der Erfolg der Thrombinspaltung wurde durch eine SDS-PAGE verifiziert.



**Abb. 3.18:** 12 %ige SDS-PAGE von SecB vor und nach der Thrombinspaltung im Vergleich. M: Marker. Bahn 1: SecB C113 mit 6x His-Tag vor der Thrombinspaltung, Bahn 2: SecB C113 ohne His-Tag nach der Thrombinspaltung.

Der Vergleich der Proteinmasse vor und nach der Thrombinspaltung ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Hierbei zeigt sich ein deutlicher Unterschied in den Molekulargewichten der SecB-Proteine vor und nach der Thrombinspaltung. Dieser bestätigt die erfolgreiche Abtrennung des 6x His-Tags vom SecB-Protein. Der berechnete Massenverlust für die Abspaltung eines 6x His-Tags durch Thrombin liegt bei ca. 1,5 kDa.

Einen weiteren Nachweis für die erfolgreiche Abspaltung des His-Tags vom Chaperon lieferte die massenspektroskopische Analyse. Das Molekulargewicht verringerte sich durch die Abspaltung um knapp 1,5 kDa (vgl. Abb. 3.19).



**Abb. 3.19:** Normiertes MALDI-ToF Massenspektrum von SecB C113 mit His-Tag (schwarz) vor der Thrombinspaltung und ohne His-Tag (rot) nach der Thrombinspaltung. Die experimentell ermittelte Massenabnahme durch die Thrombinspaltung beträgt  $\Delta m = 1495,2 \text{ Da}$ .

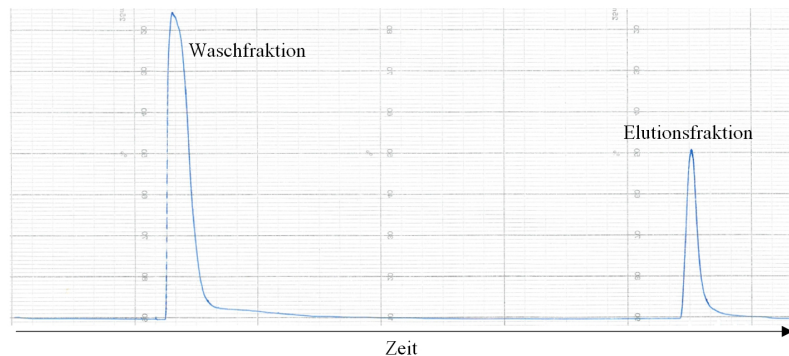
### 3.5 Expression und Isolierung von preMBP

Das in der vorliegenden Arbeit zur Komplexierung mit SecB verwendete preMBP ist das Vorläuferprotein (*Precursor*) des Maltose-bindenden Proteins (*Maltose-Binding Protein*, MBP), welches im Periplasma von Gram-negativen Bakterien für den Maltosetransport sowie zur Chemotaxis dient (Shilton *et al.*, 1996). Es besitzt ein Molekulargewicht von 40,6 kDa und besteht aus 370 Aminosäuren. Sein Vorläuferprotein preMBP ist im Vergleich zum MBP um das 26 Aminosäuren umfassende, N-terminale Signalpeptid länger und besitzt eine Masse von 43,3 kDa (Spurlino *et al.*, 1991). PreMBP ist ein natürliches Substrat des Chaperons SecB in *E. coli*. Das im Cytosol vorkommende SecB bindet an preMBP und hält dieses in einem translokationskompetenten Stadium, um an seinen eigentlichen Bestimmungsort – das Periplasma – transportiert zu werden.

In den folgenden Experimenten kamen die preMBP-Mutanten A14E (preMBP A14E) bzw. A14E, A312C (preMBP A312C) zum Einsatz. Die Mutation an Aminosäureposition 13 befindet sich im Signalpeptid und verlangsamt die Aggregation des Preproteins (Liu *et al.*, 1988). Weiterhin sorgt die Mutation dafür, dass das Signalpeptid nicht von der Signalpeptidase abgespalten wird (Krishnan, 2004). Das Cystein an Aminosäureposition 312 dient als Angriffsstelle für ein späteres Spinlabeling. Insgesamt weist die Mutante ähnliche Eigenschaften wie das Wildtyp-preMBP hinsichtlich ihrer Interaktion mit SecB auf (Hardy und Randall, 1991).

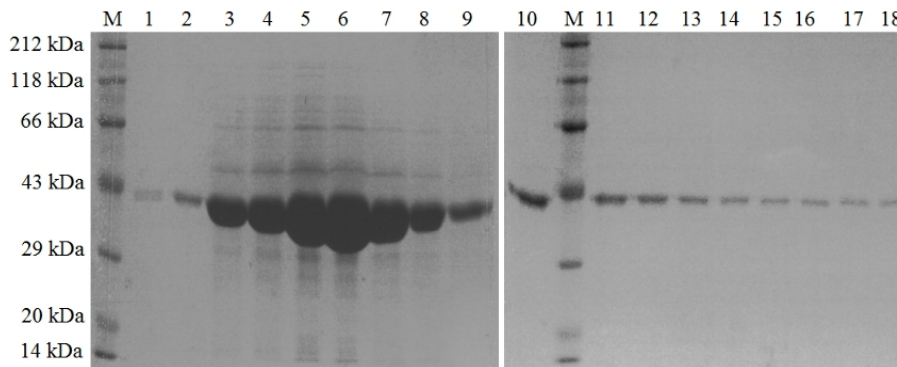
Die Expression aller preMBP-Mutanten erfolgte entsprechend der Literatur (Krishnan, 2004), wie in Kap. 5.6 auf Seite 107 beschrieben. Die beiden Plasmide, welche die Sequenz für das preMBP A14E bzw. für preMBP A312C tragen, wurden uns freundlicherweise von Prof. Raghavan Varadarajan vom Indian Institute of Science, Bangalore/Indien zur Verfügung gestellt. Beide besitzen eine Ampicillinresistenz und wurden mittels Hitzeschock in ultrakompetente Zellen transformiert. Aus 1,5 Litern Zellkultur wurden nach 21,5 Stunden Kulturdauer ca. 13 g Zellen gewonnen. Das nach der Zelllyse durch Ultraschall erhaltene Lysat wurde mittels Zentrifugation von Zelltrümmern befreit. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie über eine Amylose-Säule wie in Kap. 5.6.2 auf Seite 108 dargestellt.

Das preMBP besitzt ebenso wie das MBP eine hohe Affinität zu Amylose und heftet sich somit an das Säulenmaterial. Ungebundene Proteine wurden zunächst vom Säulenmaterial gewaschen, bevor die Elution von preMBP mit maltosehaltigem Elutionspuffer erfolgte. Die Affinität von preMBP bzw. MBP zu Maltose ist höher als die zu Amylose, so dass an das Säulenmaterial gebundene Proteine bei entsprechend hoher Maltosekonzentration vom Säulenmaterial eluieren. Das Elutionsdiagramm einer Amylose-Säule für die Isolierung von preMBP A14E ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Zur Reinheitskontrolle wurden die Elutionsfraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.21 dargestellt.



**Abb. 3.20:** Elutionsdiagramm der Amylose-Säule zur Aufreinigung von preMBP A14E. Die x-Achse zeigt die Elutionszeit, die y-Achse die relative Extinktion.

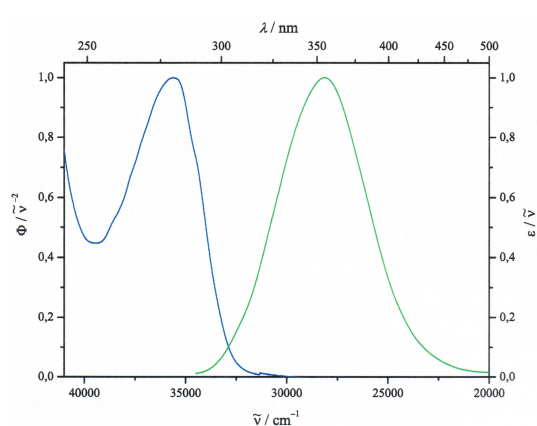




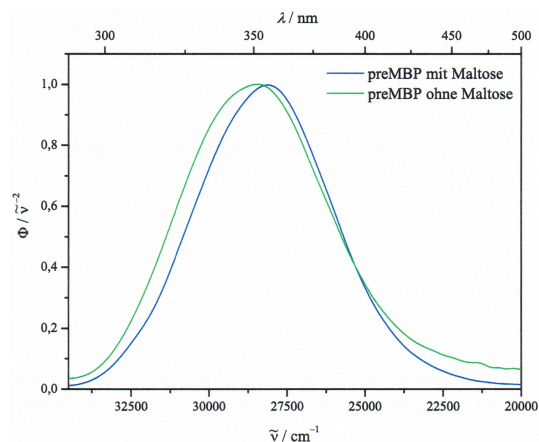
**Abb. 3.21:** 10 %ige SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Amylose-Säule mit preMBP A14E. M: Marker. Die Zahlen geben die einzelnen Elutionsfraktionen an. Bei 43 kDa ist das von der Säule eluierte preMBP, welches nun Maltose gebunden hat, zu erkennen.

Da das Chaperon SecB sein natürliches Substrat preMBP nur im maltosefreien Zustand bindet, musste diese zunächst aus dem preMBP-Maltose-Komplex entfernt werden. In Gegenwart von Guanidinhydrochlorid wurde der Komplex denaturiert (vgl. Kap. 5.6.3 auf Seite 109), so dass die Maltose das Protein verlassen konnte. Anschließend erfolgte eine größenchromatographische Auftrennung mit Hilfe einer PD-10-Säule. Aus 2,5 ml Zellysate wurden ca. 0,9 mg maltosefreies preMBP gewonnen. Zur Kontrolle wurden Fluoreszenzspektren vor und nach dem Entfernen der Maltose aufgezeichnet (siehe Kap. 5.6.4 auf Seite 109). Zunächst wurde die Anregungswellenlänge im UV/Vis-Bereich bestimmt (vgl. Abb. 3.22). Das Absorptionsmaximum liegt bei 279 nm. Anschließend wurden Fluoreszenzspektren vor und nach der Denaturierung des preMBP-Maltose-Komplexes aufgezeichnet.

Die Fluoreszenzmessung ist eine empfindliche Methode zum Nachweis von Proteinfaltungen. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin dienen hierbei als intrinsische Fluorophore (Krishnan, 2004). Im entfalteten Zustand sollte sich die Lösungsmittelzugänglichkeit der aromatischen Aminosäuren ändern, was auch eine Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften zur Folge hat. Der Vergleich der Fluoreszenzspektren von preMBP mit und ohne Maltose in Abbildung 3.23 zeigt eine Verschiebung des Emissionspeaks um 4 nm. Somit kann verifiziert werden, dass die Maltose erfolgreich vom preMBP entfernt wurde.



**Abb. 3.22:** UV- (blau) und Fluoreszenzspektrum (grün) von preMBP mit Maltose. Die Absorptions- bzw. Emissionsmaxima liegen bei 279 nm und 355,6 nm.



**Abb. 3.23:** Fluoreszenzspektrum von preMBP mit und ohne Maltose. Anregungswellenlänge: 279 nm. Emissionsmaxima: 351,6 nm und 355,6 nm.

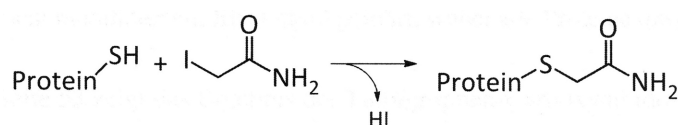
### 3.6 Das Modellsubstrat BPTI

*In vitro* bindet das Chaperon SecB viele Modellsubstrate, wie beispielsweise den Trypsininhibitor BPTI (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*) oder auch Aprotinin genannt. In seiner nativen Form enthält BPTI sechs Cysteine an den Aminosäurepositionen 5, 14, 30, 38, 51 und 55, die über drei Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind und zur Stabilisierung des Proteins beitragen (Panse *et al.*, 2001). Um SecB als Substrat dienen zu können, muss BPTI in seiner entfalteten Form vorliegen. In der vorliegenden Arbeit wurde zu Beginn einerseits ein mittels Carboxyamidomethylierung chemisch modifiziertes, entfaltetes BPTI verwendet. Außerdem wurde eine zwischenzeitlich hergestellte, rekombinante BPTI-Mutante (all-Ala-BPTI) eingesetzt, bei der alle natürlichen Cysteine in der Aminosäuresequenz durch Alanin ersetzt sind (Haimann, 2012). Mit Hilfe dieser Mutante sollte die chemische Modifizierung von kommerziellem BPTI und die damit verbundenen hohen Ausbeuteverluste durch die Carboxyamidomethylierung umgangen werden.

#### 3.6.1 Chemische Modifizierung durch Carboxyamidomethylierung

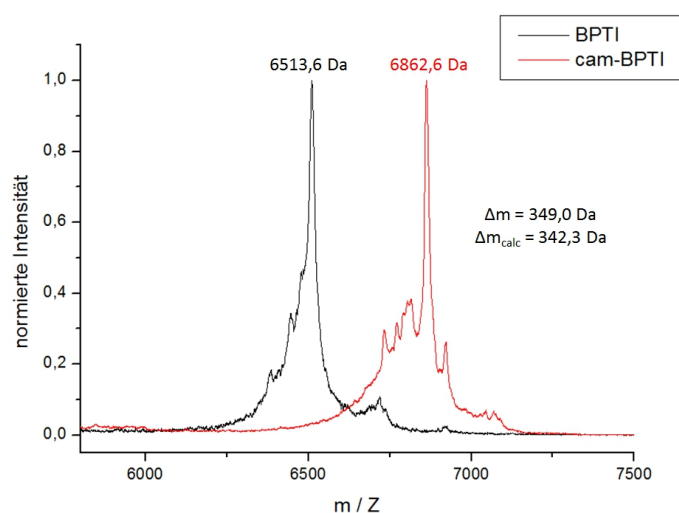
Um vom Chaperon SecB komplexiert werden zu können, müssen beim BPTI zunächst die drei Disulfidbrücken gespalten und die Cysteine mittels Carboxyamidomethylierung so verändert werden, dass keine Rückfaltung mehr stattfinden kann (Fekkes *et al.*, 1995).

Im ersten Schritt erfolgte die Denaturierung des unmodifizierten Proteins in Gegenwart von Guanidinhydrochlorid (vgl. Kap. 5.8.1 auf Seite 112). Durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) wurden die Disulfidbrücken zunächst reduziert und in einer anschließenden nukleophilen Substitution durch Zugabe von Iodacetamid carboxyamidomethyliert. Nicht umgesetztes Reagenz wurde im Anschluss säulenchromatographisch entfernt. Durch diese chemische Modifizierung ergibt sich ein berechneter Massenzuwachs von  $\Delta m_{calc} = 57,05$  Da pro Thiolgruppe. Der Mechanismus der chemischen Modifizierung ist in Abbildung 3.24 am Beispiel einer Thiolgruppe dargestellt.



**Abb. 3.24:** Mechanismus der Carboxyamidomethylierung einer Thiolgruppe des Proteins BPTI. Iodacetamid reagiert in einer nukleophilen Substitution mit der Thiolgruppe des Proteins unter Abspaltung von Jodwasserstoff.

Das carboxyamidomethylierte BPTI (cam-BPTI) wurde anschließend massenspektrometrisch vermessen, um den Erfolg anhand des Massenzuwachses zu verifizieren. Hierzu wurden Vergleichsmessungen von unmodifiziertem, käuflichem BPTI aufgenommen. Das Ergebnis der MALDI-ToF Analyse ist in Abbildung 3.25 dargestellt.



**Abb. 3.25:** Normiertes MALDI-ToF Massenspektrum von unmodifiziertem (schwarz) und carboxyamidomethyliertem BPTI (rot). Der experimentell ermittelte Massenzuwachs durch die Carboxyamidomethylierung der sechs Thiolgruppen von BPTI beträgt  $\Delta m = 349,0$  Da und der rechnerische Massenzuwachs  $\Delta m_{calc} = 342,3$  Da.

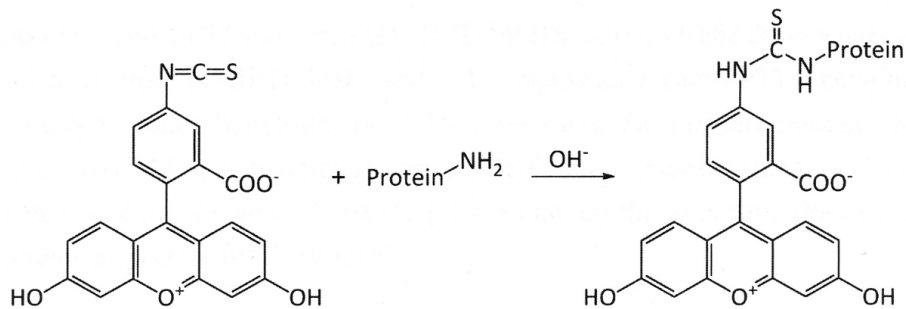
Der schwarze Graph stellt das Massenspektrum von käuflich erworbenem, unmodifiziertem BPTI dar, der rote Graph zeigt das Massenspektrum von BPTI nach der Carboxyamidomethylierung (cam-BPTI). Die erhaltene Masse von unmodifiziertem BPTI beträgt 6513,6 Da und entspricht der vom Hersteller angegebenen Größe von 6,5 kDa. Der berechnete Massenzuwachs für die durch die Carboxyamidomethylierung eingefügten sechs Thiolgruppen liegt bei insgesamt 342,3 Da. Der experimentell ermittelte Massenzuwachs beträgt 349,0 Da und stimmt etwa mit dem berechneten Wert überein. Somit kann die Alkylierung aller sechs im nativen BPTI vorhandenen Cysteine angenommen werden und dadurch die Blockierung der drei Disulfidbrücken nachgewiesen werden. Es kann von einer dauerhaften Auflösung der Tertiärstruktur von BPTI ausgegangen werden. Weiterhin zeigt das Massenspektrum, dass sich keine Anteile von chemisch unmodifiziertem BPTI in der Lösung befinden und alle Cysteine quantitativ carboxyamidomethyliert wurden.

### 3.6.2 Fluoreszenzlabeling von BPTI mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

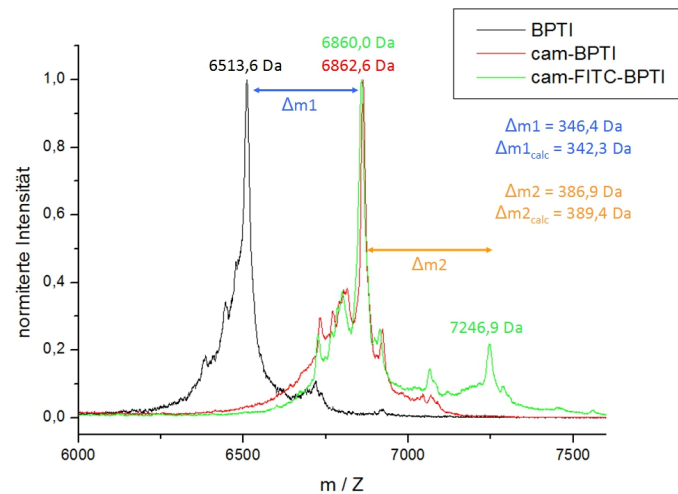
Um die Komplexbildung zwischen dem Chaperon SecB und seinem Modellsubstrat BPTI nachzuweisen, wurde das BPTI mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) bindet an die im cam-BPTI enthaltenen vier Lysine. Somit sollte bei späteren Komplexbildungsuntersuchungen zwischen dem Chaperon SecB und dem Modellsubstrat BPTI das Identifizieren BPTI-haltiger Fraktionen nach der säulenchromatographischen Auftrennung ermöglicht werden.

Im Anschluss an die Carboxyamidomethylierung erfolgte die Fluoreszenzmarkierung mit Fluoresceinisothiocyanat. Der letzte Schritt der Carboxyamidomethylierung bestand darin, das überschüssige Iodacetamid über eine Größenausschlusschromatographie abzutrennen. Die cam-BPTI-haltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und vereinigt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 9,0 erhöht, da die Aminogruppen in deprotonierter Form vorliegen müssen. In einer Additionsreaktion (vgl. Abb. 3.26) reagiert der Fluoreszenzfarbstoff mit den im cam-BPTI enthaltenen vier Lysinresten. Der berechnete Massenzuwachs beträgt  $\Delta m_{calc} = 389,38$  Da pro addiertem FITC-Molekül.

Das mit FITC gelabelte cam-BPTI wurde anschließend massenspektroskopisch untersucht, um den Erfolg der chemischen Modifizierung zu verifizieren. In Abbildung 3.27 ist das Massenspektrum von cam-FITC-BPTI im Vergleich zu unmodifiziertem, käuflich erworbenem BPTI sowie cam-BPTI dargestellt.



**Abb. 3.26:** Additionsreaktion des Fluoreszenzfarbstoffs Fluoresceinisothiocyanat (FITC) bei pH 9,0 an die im Protein enthaltenen Lysinreste. Der berechnete Massenzuwachs beträgt  $\Delta m_{calc} = 389,38$  Da pro addiertem FITC-Molekül.



**Abb. 3.27:** Normiertes MALDI-ToF Massenspektrum von chemisch modifiziertem BPTI. Vergleich von unmodifiziertem BPTI (schwarze Kurve) und cam-BPTI (rote Kurve) mit cam-FITC-BPTI (grüne Kurve). Dargestellt sind jeweils die experimentell ermittelten Massen sowie die berechneten und tatsächlich erhaltenen Massendifferenzen.

Der experimentell ermittelte Massenzuwachs von  $\Delta m_1 = 346,4$  Da von cam-BPTI (rote Kurve) im Vergleich zu unmodifiziertem BPTI (schwarze Kurve) deckt sich auch in dieser Messreihe mit dem berechneten Massenzuwachs  $\Delta m_{calc} = 342,3$  Da. Somit kann auch hier eine vollständige Entfaltung durch die Carboxyamidomethylierung aller sechs im BPTI enthaltenen Cysteine angenommen werden. Der grüne Graph zeigt den Massenzuwachs von cam-BPTI durch Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Zu beobachten sind zwei deutliche Massenpeaks bei 6860,0 Da und 7246,9 Da. Der erwartete Massenzuwachs für eine vollständige FITC-Addition an alle vier Lysine im cam-BPTI liegt bei insgesamt 1557,5 Da. Der aus der MALDI-ToF Analyse experimentell ermittelte Massenzuwachs beträgt lediglich  $\Delta m = 386,9$  Da und stimmt

somit überein mit der Molekülmasse eines FITC-Moleküls von 389,4 Da. Somit kann durch die Massendifferenz angenommen werden, dass unter den gegebenen Reaktionsbedingungen keine vollständige Addition von vier Fluoreszenzmolekülen an das cam-BPTI stattgefunden hat, sondern lediglich die Bindung an ein Lysin. Aufgrund der Übereinstimmung der beiden Massenpeaks von cam-BPTI bei 6862,6 Da und cam-FITC-BPTI bei 6860,0 Da kann verifiziert werden, dass ein Großteil von cam-BPTI im Reaktionsansatz mit FITC nicht umgesetzt wurde und somit im Massenspektrum sichtbar ist.

### 3.6.3 Expression und Isolierung von all-Ala-BPTI

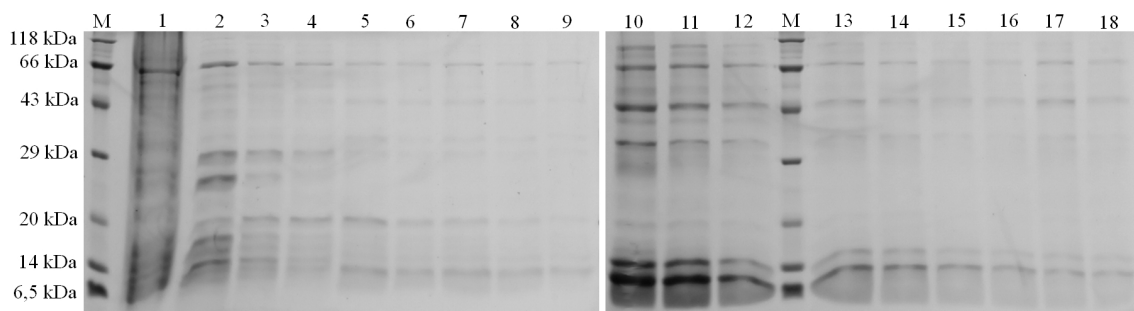
Das im Arbeitskreis vorhandene, rekombinante all-Ala-BPTI liegt in einem pET20b(+)-Vektor mit Ampicillinresistenz vor. Die für das all-Ala-BPTI codierende Gensequenz umfasst 174 bp, einen 6-fach His-Tag sowie eine Thrombinschnittstelle. Einkloniert wurde die Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI*. Die zugehörige Plasmidkarte ist im Anhang dargestellt (vgl. Abb. A.5 auf Seite 130). Der pET20b(+)-Vektor mit der entsprechenden BPTI-Sequenz wurde in ultrakompetente *E. coli* KRX-Zellen transformiert (siehe Kap. 5.3.9 auf Seite 99) und nach Anleitung in Kap. 5.7 auf Seite 110 exprimiert. Die Genexpression des BPTI-Gens unterliegt – wie auch die Expression der SecB-Gene – dem Rhamnose-Promotor und dem T7-RNA-Polymerase-Gen. Durch die Zugabe von Rhamnose wird der Promotor kontrolliert aktiviert, wobei Rhamnose selbst aufgrund einer Deletion der entsprechenden Rhamnose-Gene von der Zelle nicht metabolisiert wird (Hartnett *et al.*, 2006; Litterer und Schagat, 2007; Schagat *et al.*, 2008).

Das Zellwachstum der über Nacht gewachsenen Zellkulturen wurde am Folgetag durch Inkubation auf Eis gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Das resultierende Zellpellet wurde zur Entfernung von Nährmediumrückständen gewaschen. Anschließend erfolgte die Zelllyse mittels Ultraschall. Durch erneute Zentrifugation gelang die Trennung der löslichen Zellbestandteile von den Zelltrümmern und *Inclusion Bodies*. Das gewünschte, *E. coli*-fremde Protein war eingeschlossen in *Inclusion Bodies* und befand sich nach der Zentrifugation im resultierenden Pellet. Der Aufschluss der *Inclusion Bodies* erfolgte nach Resuspendieren des Pellets über Nacht in Anwesenheit von Guanidinhydrochlorid-haltigem Denaturierungspuffer. Nach der Zentrifugation am nächsten Tag befand sich das all-Ala-BPTI im Überstand.

### 3.6.4 Aufreinigung von all-Ala-BPTI mittels Nickelaffinitätschromatographie

Die Isolierung des all-Ala-BPTI-Proteins aus dem Lysat der *Inclusion Bodies* gelang durch Affinitätschromatographie mit Hilfe von Nickel-NTA-Agarose wie in Kap. 5.7.3 auf Seite 111 dargestellt. Der sich am all-Ala-BPTI befindende 6x His-Tag haftet sich während der Inkubation an das Säulenmaterial. Als Säulenmaterial wurde, wie bei der Aufreinigung von SecB, Sepharose CL-6B verwendet, an welche Nitrilotriessigsäure als Chelatbildner für Nickel-Ionen gebunden ist. An diese komplexierten Nickel-Ionen bindet der His-Tag und ermöglicht dadurch die gezielte Isolierung von all-Ala-BPTI in hoher Reinheit. Alle ungebundenen bzw. unspezifisch gebundenen Proteine werden bei niedriger Imidazolkonzentration vom Säulenmaterial gewaschen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Histidin und Imidazol (vgl. Kap. 3.14 auf Seite 43) verdrängt das Imidazol bei Konzentrationen von 500 mM den an das Säulenmaterial gebundenen His-Tag und das all-Ala-BPTI eluiert von der Säule.

In Abweichung zur chromatographischen Aufreinigung von SecB wurden zur Aufreinigung von all-Ala-BPTI mittels Nickel-Affinitätschromatographie zwei Waschschrte mit erhöhter Imidazol-Konzentration durchgeführt. Es sollten größere Verunreinigungen durch unspezifisch gebundene Proteine entfernt werden, jedoch eine verfrühte Elution von BPTI durch eine zu hohe Imidazol-Konzentration verhindert werden. Die Elutionsfraktionen der Nickel-NTA-Säule wurden mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 3.28).



**Abb. 3.28:** 12 %ige SDS-PAGE der Wasch- und Elutionsfraktionen der Nickel-NTA-Säule mit all-Ala-BPTI. M: Marker. Die Zahlen geben die jeweiligen Elutionsfraktionen an. Bahnen 1 – 4: Waschfraktionen mit 50 mM Imidazol, Bahnen 5 – 9: Waschfraktionen mit 100 mM Imidazol, Bahnen 10 – 18: Waschfraktionen mit 500 mM Imidazol.

Das Molekulargewicht des natürlichen Trypsininhibitors liegt bei 6,5 kDa (Mahdy und Webster, 2004). Jedoch ist beim rekombinanten all-Ala-BPTI zu beachten, dass zur erleichterten Aufreinigung im Zuge der Klonierung ein His-Tag und eine Thrombinschnitt-

stelle eingefügt wurden. Somit lässt sich die Erhöhung des Molekulargewichts um 1,5 kDa auf 8 kDa erklären (vgl. Kap. 3.4.3 auf Seite 47).

Das SDS-Gel in Abbildung 3.28 zeigt, dass ein Großteil der unspezifisch gebundenen Proteine mit dem Waschpuffer bei einer Konzentration von 50 mM Imidazol bereits von der Säule eluierte. Die mit 100 mM Imidazol von der Säule gewaschenen Fraktionen (Bahnen 5 – 9) zeigen eine eher geringe Entfernung von weiteren unspezifisch gebundenen Proteinen. In den Bahnen 5 bis 9 ist im unteren Bereich des Gels eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 8 kDa sichtbar. Aufgrund des Molekulargewichts könnte es sich hierbei um eine frühzeitige Elution des gewünschten all-Ala-BPTI handeln. Die Elutionsfraktionen in den Bahnen 10 bis 18 zeigen bei ca. 8 kDa das gewünschte Protein. Jedoch sind im oberen Teil des SDS-Gels höhermolekulare Verunreinigungen zu erkennen, die mit der Nickelsäule nicht abgetrennt werden konnten. Weiterhin ist in den Elutionsfraktionen im Bereich von ca. 13 kDa eine weitere, deutliche Proteinbande erkennbar. Die all-Ala-BPTI-haltigen Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit einem Mikrokonzentrator aufkonzentriert. Durch die Verwendung einer Membran mit geringer Porengröße erfolgte zumindest die Abtrennung der höhermolekularen Verunreinigungen. Die Abtrennung des 13 kDa-Proteins gelang auf diese Weise jedoch nicht.

Die Identifizierung der Proteinbande bei 8 kDa gelang bereits in einer Arbeit von Haimann und konnte als das gewünschte Protein all-Ala-BPTI bestätigt werden (Haimann, 2012). Es sollte weiterhin auch die Identität der Proteinbande bei 13 kDa geklärt werden, um eine Aussage darüber machen zu können, ob dieses Protein die Komplexbildung zwischen dem Chaperon SecB und dem Modellsubstrat BPTI beeinflussen könnte. Haimann konnte nach dem tryptischen Verdau dieser Gelbande und der anschließenden massenspektroskopischen Analyse Spuren von zwei Proteinen nachweisen. Der Datenbankabgleich zeigte eine Übereinstimmung mehrerer Peptid-Fragmente mit dem ribosomalen Protein S19. Weiterhin fand sich ein Peptid, welches der ATP-Synthase  $\epsilon$ -Kette der  $F_1$ -Untereinheit zugeordnet werden konnte. Das Molekulargewicht des ribosomalen Proteins S19 liegt bei 10,3 kDa und ist somit geringer als die auf dem SDS-Gel detektierte Bande. Die  $\epsilon$ -Kette der  $F_1$ -Untereinheit der ATP-Synthase hat ein Molekulargewicht von 14,9 kDa und liegt damit leicht oberhalb der experimentell ermittelten Größe der unbekanntenen Proteinbande. Beides sind *E. coli*-eigene Proteine, die jedoch in ihrer Aminosäuresequenz keine histidinreichen Abschnitte aufweisen, die die Wechselwirkung mit dem Nickel-NTA-Säulenmaterial erklären würden. Die Identifizierung des unbekanntenen Proteins gelang somit nicht (Haimann, 2012).

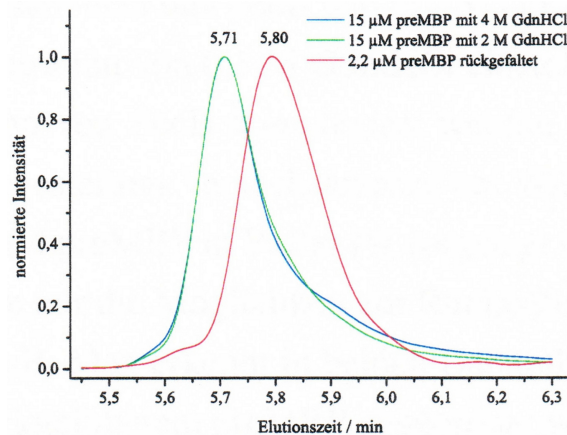


### 3.7 Nachweis des SecB-preMBP-Komplexes mittels HPLC

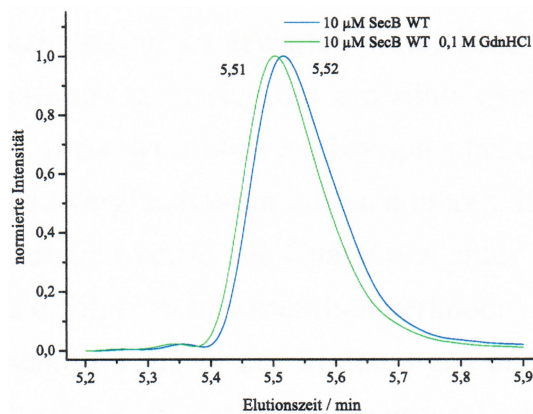
Der Nachweis zur Komplexbildung zwischen SecB und seinem natürlichen Substrat preMBP wurde mit Hilfe der *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) durchgeführt. Verwendet wurde eine nach dem Größenausschlussprinzip arbeitende hydrophile Gelfiltrationssäule mit einem linearen Trennbereich von 10 bis 250 kDa. Die Retentionszeit für Moleküle ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Sehr große Moleküle werden von den Poren des Säulenmaterials ausgeschlossen, haben somit den kürzesten Weg durch die Säulenmatrix und eluieren folglich zuerst. Kleinere Moleküle haben höhere Retentionszeiten, denn sie können in die Poren des Säulenmaterials eindringen und haben dadurch den längeren Weg. Da die Proteingröße mit dem Molekulargewicht korreliert, eluieren schwere Proteine früher von der Säule als leichtere.

Das Chaperon SecB bindet sein natürliches Substrat preMBP nur im entfalteten, maltosefreien Zustand. Die Entfaltung von preMBP erfolgte in Gegenwart von Guanidiniumhydrochlorid. Wie Abbildung 3.29 zeigt, reicht eine Konzentration von 2 M GdnHCl aus, um das preMBP vollständig zu entfalten (grüne Kurve). Eine höhere Konzentration von 4 M zeigt keinen Einfluss auf das preMBP (blaue Kurve). Rückgefaltetes preMBP (rote Kurve) ist wesentlich kompakter als entfaltetes und hat somit eine längere Retentionszeit von 5,8 Minuten im Vergleich zu 5,71 Minuten von entfaltetem preMBP.

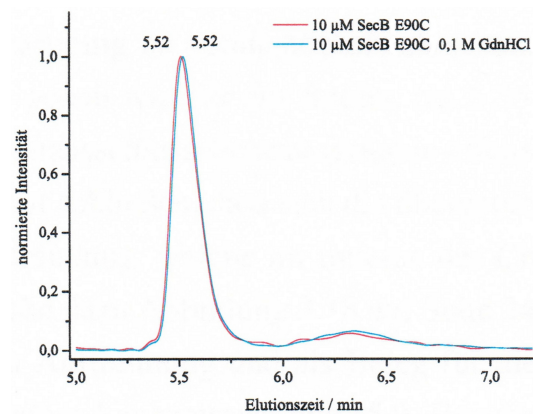
Die Konzentration an Guanidiniumhydrochlorid sollte so gering wie möglich gewählt werden, dass einerseits das preMBP vollständig entfaltet vorliegt, jedoch nach Zugabe des SecB nicht entfaltet wird und somit nicht mehr in der Lage ist, das preMBP zu binden. Die Abbildungen 3.30 und 3.31 zeigen, dass eine Endkonzentration von 0,1 M Guanidiniumhydrochlorid keinerlei Einfluss auf die Konformation des Chaperons hat. Zum Vergleich ist in Abbildung 3.32 der teilweise Zerfall des SecB WT-Proteins in die Monomere nach 5-minütiger Hitzedenaturierung dargestellt. Das Monomer des SecB WT-Proteins besitzt ein Molekulargewicht von 17,2 kDa und somit im Vergleich zum Tetramer eine längere Elutionszeit von 6,31 Minuten anstatt 5,5 Minuten. Die im Folgenden abgebildeten Elutionsdiagramme sind zum besseren Vergleich auf das jeweilige Optimum normiert.



**Abb. 3.29:** Normiertes HPLC-Elutionsdiagramm von preMBP. Einfluss von GdnHCl auf die Konformation von preMBP A14E. Rückgefaltetes preMBP eluiert später von der Säule als in GdnHCl entfaltetes Protein.



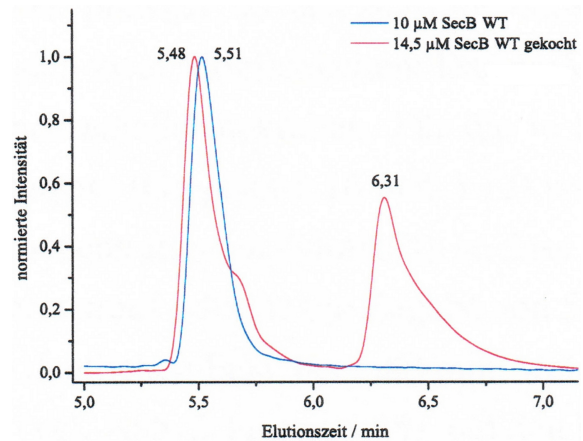
**Abb. 3.30:** Normiertes HPLC-Elutionsdiagramm des SecB WT-Proteins. Einfluss von GdnHCl auf die Konformation von SecB WT. Die Anwesenheit von 0,1 M GdnHCl zeigt keinen Einfluss auf die Elutionszeit von SecB WT.



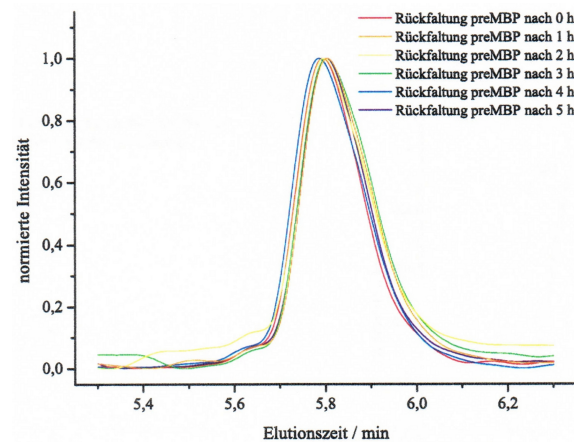
**Abb. 3.31:** Normiertes HPLC-Elutionsdiagramm des SecB E90C-Proteins. Einfluss von GdnHCl auf die Konformation von SecB E90C. Die Anwesenheit von 0,1 M GdnHCl zeigt keinen Einfluss auf die Elutionszeit von SecB E90C.

Weiterhin wurde untersucht, wie schnell die Rückfaltung von preMBP nach Verringerung der GdnHCl-Konzentration erfolgt. Das maltosefreie preMBP wurde in einem Puffer mit 3 M GdnHCl gelagert (vgl. Kap. 5.6.3 auf Seite 109). Zur Rückfaltung wurde das preMBP mit einem GdnHCl-freien Puffer so verdünnt, dass eine Endkonzentration an GdnHCl von 0,1 M erreicht wurde. Die Proteinkonzentration verringerte sich dabei auf 2,2 µM. Die Rückfaltung von preMBP erfolgte sofort nach Verringerung der GdnHCl-Konzentration auf 0,1 M und nicht, wie in der Literatur beschrieben (Randall *et al.*, 1990), nach 5-stündiger Inkubation (siehe Abb. 3.33).

**Abb. 3.32:** Normiertes HPLC-Elutionsdiagramm von SecB WT nach Denaturierung durch Hitzeinwirkung. Durch die Hitzedenaturierung zerfällt das Chaperon teilweise in die Monomere, welche nach 6,31 min von der Säule eluieren.



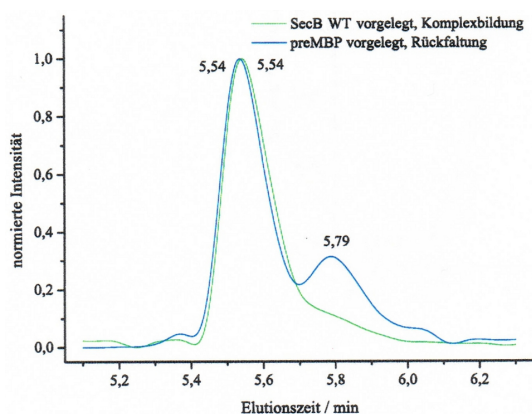
**Abb. 3.33:** Normiertes HPLC-Elutionsdiagramm der Rückfaltung von preMBP A14E nach 0- bis 5-stündiger Inkubation auf Eis in Gegenwart von 0,1 M Gdn-HCl. Die Inkubationsdauer zeigt keinerlei Einfluss auf die Rückfaltung von preMBP.



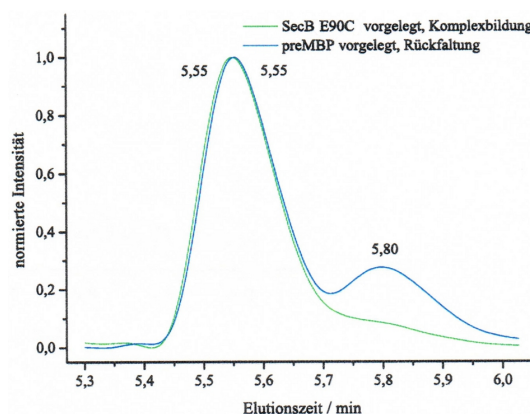
Abschließend wurde die Komplexbildung zwischen SecB und preMBP untersucht. Nach der Entfaltung von preMBP in Gegenwart von 2 M GdnHCl und Zugabe zum Chaperon, so dass sich eine Endkonzentration von 0,1 M GdnHCl einstellt, bieten sich zwei Möglichkeiten: Das preMBP kann sich entweder direkt zurückfalten oder es wird von SecB komplexiert und bleibt im entfalteten Zustand. Im ersten Versuchsansatz wurde 1 µM entfaltetes preMBP in Puffer vorgelegt, so dass eine GdnHCl-Endkonzentration von 0,1 M vorhanden war. Sofort darauf erfolgte die Zugabe von 5 µM SecB WT (Abb. 3.34) bzw. SecB E90C (Abb. 3.35). In beiden Elutionsdiagrammen (blaue Kurve) erkennt man einen Elutionspeak nach 5,79 Minuten bzw. 5,8 Minuten, welcher rückgefaltetem preMBP zugeordnet werden kann (vgl. Abb. 3.29 und 3.33) und einen Elutionspeak von SecB bei 5,54 Minuten bzw. 5,55 Minuten (vgl. Abb. 3.30 und 3.31).

In einer zweiten Versuchsreihe wurden zunächst 5 µM SecB WT bzw. SecB E90C vorgelegt und anschließend 0,25 µM entfaltetes preMBP zugegeben. Die GdnHCl-Endkonzentration lag ebenfalls bei 0,1 M. Wie in den beiden Abbildungen 3.34 und 3.35 an der

grünen Kurve zu erkennen ist, zeigt sich kein Elutionspeak von preMBP bei 5,8 Minuten. Das preMBP lag vermutlich im Komplex mit SecB vor. Dass SecB und der SecB-preMBP-Komplex bei der Größenausschlusschromatographie zur selben Zeit eluieren, lässt darauf schließen, dass sich die Gesamtgeometrie des Chaperons durch die Substratbindung, die laut Xu *et al.* im Inneren des Proteins stattfindet (Xu *et al.*, 2000), nicht wesentlich verändert (vgl. Abb. 3.6 auf Seite 33).



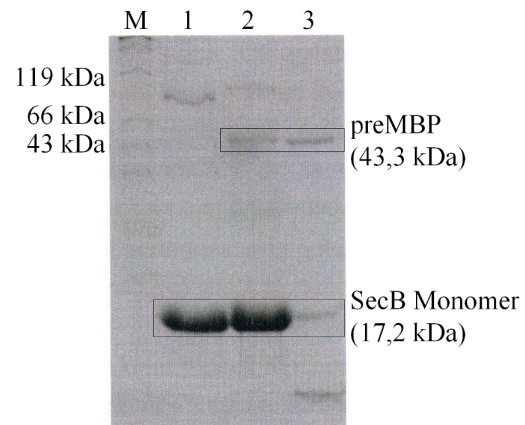
**Abb. 3.34:** Normiertes HPLC-Elutionsdiagramm der Komplexbildung zwischen SecB WT und preMBP A14E. Wird das Wildtyp-Chaperon vorgelegt und anschließend preMBP zugegeben, erfolgt eine Komplexbildung. Wird preMBP vorgelegt und dann das Chaperon zugesetzt, kommt es zur Rückfaltung von preMBP.



**Abb. 3.35:** Normiertes HPLC-Elutionsdiagramm der Komplexbildung zwischen SecB E90C und preMBP A14E. Wird das SecB E90C-Protein vorgelegt und anschließend preMBP zugesetzt, erfolgt eine Komplexbildung. Im umgekehrten Fall findet die Rückfaltung von preMBP statt und es erfolgt keine Komplexbildung.

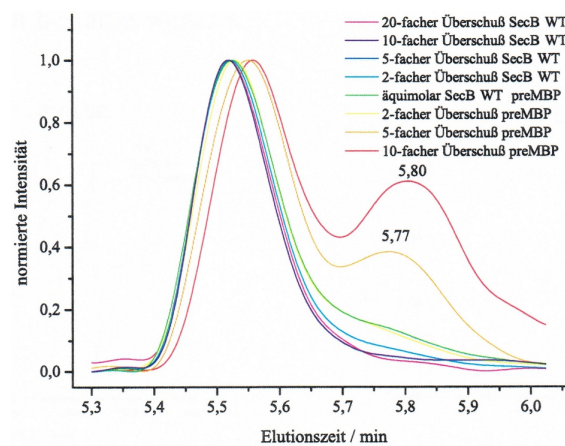
Als Nachweis für die erfolgte Komplexbildung zwischen SecB WT und preMBP wurden die Elutionsfraktionen des vermuteten SecB WT-preMBP-Komplexes aus Abbildung 3.34 (grüne Kurve) gesammelt, anschließend durch TCA-Fällung (siehe Kap. 5.2.2.2, Seite 93) aufkonzentriert und schließlich mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 3.36). Zu Beginn ist im Elutionspeak nur SecB enthalten (Bahn 1), in der zweiten Hälfte des Peaks (Bahnen 2 und 3) eluieren SecB und preMBP gleichzeitig, was als Beleg für eine erfolgreiche Komplexbildung gedeutet werden kann.

In einem weiteren Versuch wurde der Überschuss an SecB bzw. preMBP variiert und der Einfluss auf die Komplexbildung untersucht. Bei einem fünf- bzw. zehnfachen preMBP-Überschuss im Vergleich zum SecB WT (orangener und roter Graph in Abb. 3.37) ist



**Abb. 3.36:** 12 %ige SDS-PAGE des SecB WT-preMBP A14E-Komplexes nach TCA-Fällung. M: Marker.

ein Elutionspeak nach einer Retentionszeit von 5,8 bzw. 5,77 Minuten zu erkennen, was der Elutionszeit von rückgefaltetem preMBP entspricht. Der Überschuss an preMBP war entweder zu groß, so dass das überschüssige preMBP nicht vom Chaperon komplexiert werden konnte und sich rückfaltete oder die Konzentration an GdnHCl war durch die erhöhte Substratzugabe so hoch, dass das Chaperon bereits teilentfaltet vorlag und nicht mehr in der Lage war, das Substrat zu binden. Der Zerfall in die Untereinheiten hatte offensichtlich noch nicht stattgefunden, denn eine frühere Untersuchung hatte gezeigt, dass durch Hitzedenaturierung entfaltetes SecB erst nach ca. 6,3 min von der Säule eluiert (vgl. Abb. 3.32).



**Abb. 3.37:** Normiertes HPLC-Elutionsdiagramm der Komplexbildung zwischen SecB WT und preMBP A14E mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen. Die Retentionszeiten für den SecB-preMBP-Komplex bzw. das SecB liegen zwischen 5,52 und 5,55 Minuten. Bei 5,77 bzw. 5,8 Minuten ist rückgefaltetes preMBP zu erkennen.

Bei einem zweifachen preMBP-Überschuss sowie bei äquimolarer Zugabe ist kein rückgefaltetes preMBP zu erkennen bzw. die Intensität ist zu gering, so dass sich lediglich eine Verbreiterung im Randbereich des Elutionspeaks des SecB-preMBP-Komplexes zeigt. Ab einem zweifachen Überschuss an SecB im Vergleich zum preMBP tritt lediglich ein Elutionspeak nach einer Retentionszeit von ca. 5,52 Minuten auf, was der Elutionszeit des SecB-preMBP-Komplexes entspricht. Durch den Überschuss an SecB ist das Chaperon offensichtlich in der Lage, sämtliche preMBP-Moleküle zu komplexieren.

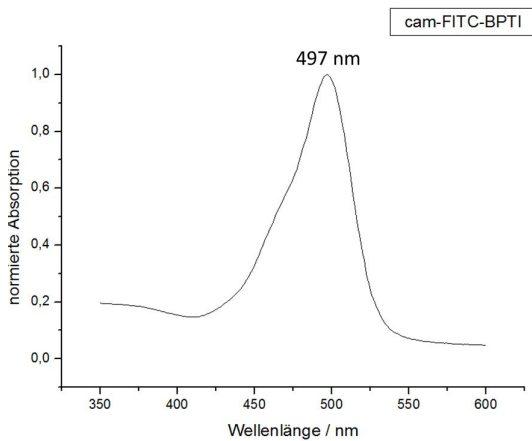
### **3.8 Nachweis des SecB-BPTI-Komplexes mittels Fluoreszenz**

Für die Komplexbildung ist es von Vorteil, das Substrat möglichst im Überschuss zum Chaperon zu geben. PreMBP wurde jedoch durch 3 M Guanidiniumhydrochlorid im Puffer in einem entfalteten, bindungskompetenten Zustand gehalten. Bei der Zugabe von preMBP zum SecB muss darauf geachtet werden, dass durch das zugegebene Denaturierungsreagenz das Chaperon nicht (teil-)entfaltet wird. Aus diesem Grund gelang es nicht, das Substrat in einem deutlich Überschuss dem SecB zuzusetzen.

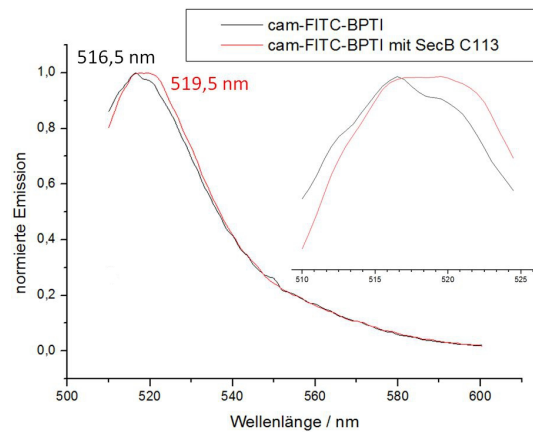
In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem natürlichen Substrat preMBP ebenfalls mit dem Modells substrat BPTI gearbeitet. Der Trypsin Inhibitor BPTI kann durch chemische Modifizierung der Cysteine mittels Carboxyamidomethylierung in einem dauerhaft entfalteten Zustand gehalten werden, ohne dass die Zugabe eines chemischen Denaturierungsmittels wie beispielsweise Guanidiniumhydrochlorid notwendig ist. Hierdurch gelang es, das Substrat für die Komplexbildung im Überschuss zum Chaperon zu geben.

In früheren Komplexbildungsstudien wurde mittels HPLC der Chaperon-preMBP-Komplex untersucht. Die Messungen zeigten eine zeitgleiche Elution von freiem SecB sowie komplexiertem SecB. Mittels SDS-PAGE konnten im Elutionspeak beide Proteine nachgewiesen werden (vgl. 3.36 auf Seite 62). Da im Falle der Mutante SecB C113 und des Modells substrats BPTI ebenfalls eine Koelution von Komplex und freiem SecB wahrscheinlich war, sollte der Komplex mittels Fluoreszenz-Untersuchung nachgewiesen werden. Hierzu wurde das cam-BPTI mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gelabelt (vgl. Kap. 3.6.2 auf Seite 53). Zunächst wurde die Anregungswellenlänge des cam-FITC-BPTI im UV/Vis bestimmt. Das Absorptionsmaximum liegt bei 497 nm (vgl. Abb. 3.38). Anschließend wurden Fluoreszenzspektren von cam-FITC-BPTI mit und ohne SecB aufgenommen (vgl. Abb. 3.39). Der Vergleich der beiden Graphen zeigt, dass sich durch die

Anwesenheit des Chaperons die Umgebung des Fluoreszenzlabels am BPTI ändert und es deshalb zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums um 3 nm kommt. Somit kann von einer Komplexbildung zwischen Substrat und Chaperon ausgegangen werden.



**Abb. 3.38:** UV/Vis-Absorptionsspektrum von cam-FITC-BPTI. Das Absorptionsmaximum liegt bei 497 nm.

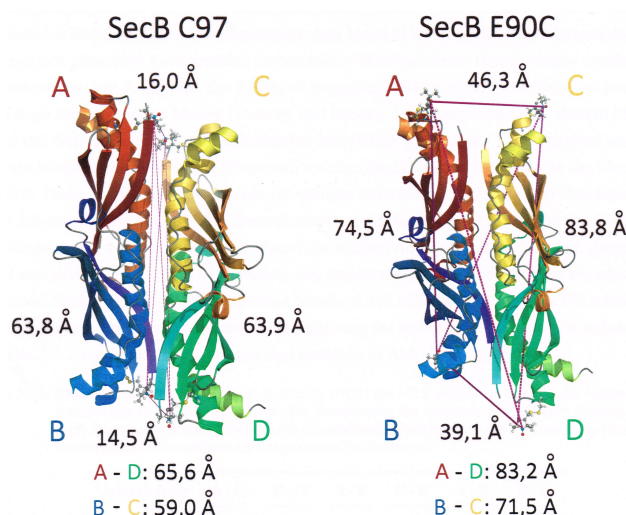


**Abb. 3.39:** Fluoreszenzspektrum von cam-FITC-BPTI mit und ohne SecB. Anregungswellenlänge 497 nm. Emissionsmaxima: 516,5 nm und 519,5 nm. Inset: Vergrößerter Ausschnitt des Emissionsspektrums zwischen 510 und 525 nm.

### 3.9 Molecular Modeling von SecB

Zur Abstandsberechnung zwischen den Spinlabeln in jeder der vier Untereinheiten des SecB-Proteins wurden die räumlichen Strukturen für alle Mutanten im substratfreien Zustand mittels *Molecular Modeling* berechnet. Als Grundlage diente der Datensatz der Kristallstruktur von *E. coli* SecB WT (PDB Code: 1QYN, RCSB PDB) (Dekker *et al.*, 2003), der hinsichtlich der entsprechenden Aminosäuremodifikationen mit Hilfe des Programms *Discovery Studio 2.5* (Accelrys) angepasst wurde. Für die Mutante SecB C97 wurde in jeder der vier Untereinheiten an den Aminosäurepositionen 76, 102 und 113 das natürlich vorhandene Cystein durch ein Alanin ersetzt. Weiterhin wurde an jeder Untereinheit an der Position C97 ein MTS-Spinlabel angehängt. Entsprechend wurden beim Modeling der Mutante SecB C113 die natürlichen Cysteine an den Positionen 76, 97 und 102 durch Alanin ersetzt und an allen vier Untereinheiten an der Aminosäureposition C113 ein MTS-Spinlabel angehängt. Für die Mutanten SecB E90C und C109 wurde analog verfahren.

Anschließend wurde eine energiearme Konformation der Spinlabel innerhalb des Chaperons durch Energieminimierung mit Hilfe von molekulardynamischen Rechnungen ermittelt. Hierzu wurde das Kraftfeld charm22 der Kraftfeld-Maschine CHARMM mit den Minimierungsalgorithmen *Steepest Descent* und *Conjugated Gradient* angewandt. Im nächsten Schritt wurde ein Erhitzen auf 300 K und ein langsames Abkühlen auf 0 K zur Überwindung potenzieller Rotationsbarrieren simuliert. Während des Abkühlens wurde dem Molekül gestattet, eine energetisch günstige Konformation einzunehmen. Die modellierten SecB-Chaperone sind in Abbildung 3.40 exemplarisch für die SecB-Mutanten C97 sowie E90C dargestellt. Alle ermittelten Distanzen sind in Tab. 3.3 enthalten. Die jeweilige paarweise Ähnlichkeit zwischen den Abständen A – C und B – D sowie A – B und C – D spiegelt die verzerrt, tetraedrische Symmetrie des Proteins wider.



**Abb. 3.40:** *Molecular Modeling* am Beispiel der SecB-Mutanten C97 und E90C. Die einzelnen Untereinheiten des Tetramers sind farbig dargestellt. Weiterhin sind die berechneten Abstände zwischen den Nitroxid-Radikalen der MTS-gelabelten Cysteine angegeben (Haimann *et al.*, 2011).

**Tab. 3.3:** Abstände zwischen den Nitroxid-Radikalen der MTS-gelabelten Cysteine der *E. coli* SecB-Mutanten C97, E90C, C109 und C113. Die Abstandsbestimmung erfolgte nach Simulation der SecB-Strukturen mit MTS-Labels an den jeweiligen Aminosäurepositionen und deren Energieminimierung aus 170 resultierenden energiearmen Konformationen.

Position	A – C	B – D	A – B	C – D	A – D	B – C
SecB C97	16,0 Å	14,5 Å	63,8 Å	63,9 Å	65,6 Å	59,0 Å
SecB E90C	46,3 Å	39,1 Å	74,5 Å	83,8 Å	83,2 Å	71,5 Å
SecB C109	11,9 Å	12,7 Å	19,7 Å	31,8 Å	28,1 Å	27,8 Å
SecB C113	13,2 Å	13,2 Å	15,7 Å	16,7 Å	17,5 Å	6,51 Å



### 3.10 Site-Directed Spinlabeling der SecB-Mutanten

Mit Hilfe von *Site-Directed Spinlabeling* werden EPR-aktive Zentren mit ungepaarten Elektronen, sog. Spinlabel, in das Chaperon eingebracht, um Abstandsmessungen und Untersuchungen zur Konformationsänderung durch Substratbindung durchzuführen. Die im Protein vorhandenen Cysteine dienen hierbei den Spinlabeln als Angriffsstelle. Mit Hilfe dieser paramagnetischen Zentren lassen sich neben Untersuchungen zu möglichen Konformationsänderungen des Chaperons durch Substratbindung auch Informationen über die Mobilität der Spinlabel sowie die Polarität der Spinumgebung gewinnen (Steinhoff *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den luft- und temperaturbeständigen Spinlabeln 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- $\Delta^3$ -pyrrolidin-3-methylthiosulfonat (MTS) bzw. mit 4-(3-Iod-2-oxopropyliden-1-yl)-2,2,3,5,5-pentamethyl-imidazolin-1-oxyl (IOPI) (vgl. Abb. 3.41 und 3.42) gearbeitet. Beide Nitroxid-Radikale binden in einer  $S_N2$ -Reaktion unter Ausbildung einer kovalenten Bindung an im Protein vorhandene Cysteine. Das MTS-Molekül hat den Vorteil, dass es etwas kleiner ist und sehr viel spezifischer mit Thiolgruppen reagiert als IOPI, jedoch ist die Stabilität der gebildeten Disulfidbrücke geringer. In Abbildung 3.43 ist der Reaktionsmechanismus schematisch für das MTS-Label dargestellt. Der hierdurch verursachte Massenzuwachs des Proteins liegt pro MTS-Molekül bei 185,3 Da und für IOPI bei 210,14 Da.

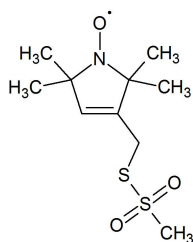


Abb. 3.41: Molekülstruktur des MTS-Spinlabels.

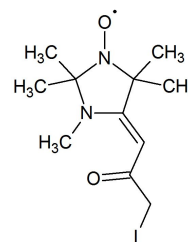
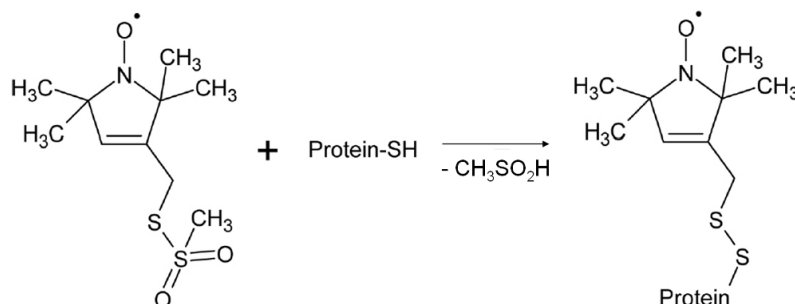


Abb. 3.42: Molekülstruktur des IOPI-Spinlabels.

Das Spinlabeling erfolgte nach modifizierter Vorschrift von Crane *et al.* wie in Abschnitt 5.11.1 auf Seite 116 beschrieben (Crane *et al.*, 2005). Um ein möglichst vollständiges Labeling aller Cysteine im SecB-Monomer zu erreichen, wurde das Spinlabel deutlich im Überschuss zugesetzt. Die Entfernung von ungebundenen Spinlabeln erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie aus dem Reaktionsgemisch, um weitere unspezifische Reaktionen in späteren Untersuchungen zu vermeiden.

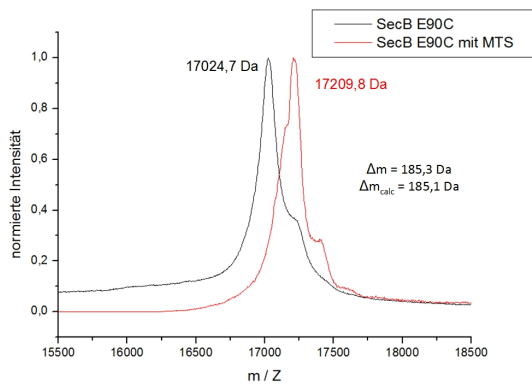


**Abb. 3.43:** Das Spinlabel MTS reagiert in einer  $S_N2$ -Reaktion mit der Thiolgruppe eines zugänglichen Cysteins unter Ausbildung einer Disulfidbrücke. Bei der Reaktion wird Methansulfonsäure ( $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{H}$ ) abgespalten. Bei der analogen Reaktion von IOPI mit einer Thiolgruppe wird anstatt Methansulfonsäure Iodwasserstoff abgespalten (Mechanismus nicht dargestellt).

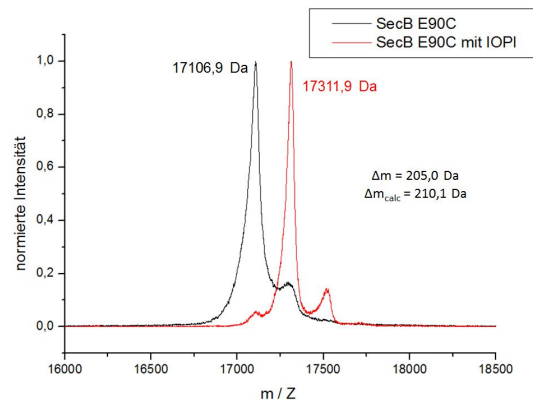
### 3.10.1 Massenspektroskopische Analyse von spinlabeltem SecB

Um den Erfolg des Spinlabeling zu verifizieren, wurden MALDI-ToF Massenspektren der ungelabelten und der gelabelten Chaperone im unverdauten Zustand analysiert. Das Ergebnis ist exemplarisch für die SecB-Mutante E90C in den Abbildungen 3.44 und 3.45 dargestellt. Detektiert werden in beiden Fällen die monomeren SecB-Untereinheiten, da die Tetramere durch den Laserbeschuss während der Messung zerfallen. Durch das Labeling des SecB-Monomers mit MTS wird ein Massenzuwachs von 185,3 Da erwartet. Die experimentell ermittelte Massendifferenz beträgt 185,1 Da und stimmt somit sehr gut mit dem erwarteten Massenzuwachs überein. Das Massenspektrum des spinmarkierten Proteins in Abbildung 3.44 (roter Graph) zeigt keinen Massenpeak von ungelabeltem SecB. Somit kann angenommen werden, dass jedes der vier Cysteine an Aminosäureposition 90 im SecB-Tetramer ein MTS-Spinlabel trägt.

Der berechnete Massenzuwachs für das IOPI-Spinlabel liegt bei 210,1 Da. Das Massenspektrum in Abbildung 3.45 zeigt einen ermittelten Massenzuwachs von 205,0 Da, der ebenfalls in guter Übereinstimmung mit dem berechneten Zuwachs liegt. Auch in diesem Massenspektrum sind keinerlei Anteile von ungelabeltem Chaperon zu erkennen. Unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen hat auch hier ein vollständiges Spinlabeling aller SecB-Monomere stattgefunden.



**Abb. 3.44:** MALDI-ToF Massenspektrum von MTS-gelabeltem SecB E90C. Dargestellt sind die Spektren des ungelabelten SecB E90C (schwarzer Graph) und des MTS-gelabelten SecB E90C (roter Graph). Der experimentell ermittelte Massenzuwachs durch das MTS-Spinlabel liegt bei 185,1 Da, der berechnete Massenzuwachs beträgt 185,3 Da.



**Abb. 3.45:** MALDI-ToF Massenspektrum von IOPI-gelabeltem SecB E90C. Dargestellt sind die Spektren des ungelabelten SecB E90C (schwarzer Graph) und des IOPI-gelabelten SecB E90C (roter Graph). Der experimentell ermittelte Massenzuwachs durch das IOPI-Spinlabel liegt bei 210,14 Da, der berechnete Massenzuwachs beträgt 205,0 Da.

### 3.11 Electron Paramagnetic Resonance-Messungen (EPR)

Die im Folgenden dargestellten EPR-Messungen wurden zunächst an der SecB-Mutante E90C und am Wildtyp-Protein durchgeführt. Als Spinlabel wurden MTS bzw. IOPI eingesetzt, als Modellsubstrat BPTI sowie das Vorläuferprotein des Maltose-bindenden Proteins (preMBP). Im Falle von BPTI wurde mit einem vierfachen molaren Überschuss an Substrat bezogen auf das SecB-Monomer gearbeitet, um den Signalanteil an unkomplexiertem tetrameren Chaperon auf ein Minimum zu reduzieren. PreMBP konnte nicht im Überschuss zugegeben werden, da dieses aufreinigungsbedingt mittels Guanidinhydrochlorid in einem entfalteten Zustand gehalten werden musste, um dem Chaperon als Substrat dienen zu können (vgl. Kap. 5.6.2 auf Seite 108). Nach der Aufreinigung lag das Protein in einem Puffer mit einer Konzentration von 3 M Guanidinhydrochlorid vor. Vorher durchgeführte HPLC-Messungen zur Untersuchung des Einflusses von Denaturierungsmitteln auf die Konformation des SecB-Wildtyp-Proteins bzw. auf die Mutante E90C verdeutlichten, dass die Anwesenheit von 0,1 M Guanidinhydrochlorid keinerlei Einfluss auf die Konformation des Chaperons hat (vgl. Abb. 3.30 und Abb. 3.31 auf Seite 59). Um eine Entfaltung oder auch Teilentfaltung des Chaperons in Anwesenheit von preMBP

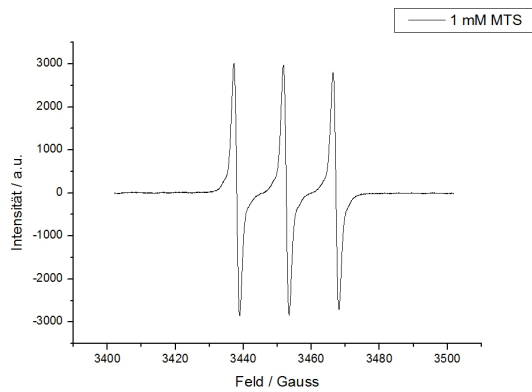
durch eine zu hohe Konzentration an Denaturierungsmittel zu verhindern, wurde auf einen Überschuss des Substrats verzichtet und eine Maximalkonzentration an Guanidinhydrochlorid von 0,1 M eingehalten.

Die Ausbildung und Charakterisierung des preMBP- sowie des BPTI-Chaperon-Komplexes wurde ausführlich in den Abschnitten 3.7 und 3.8 erläutert. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden nachfolgend EPR-Untersuchungen an substratfreien sowie substratgebundenen SecB-Mutanten durchgeführt, um Aufschluss über eine potenzielle Konformationsänderung durch die Substratbindung zu erhalten.

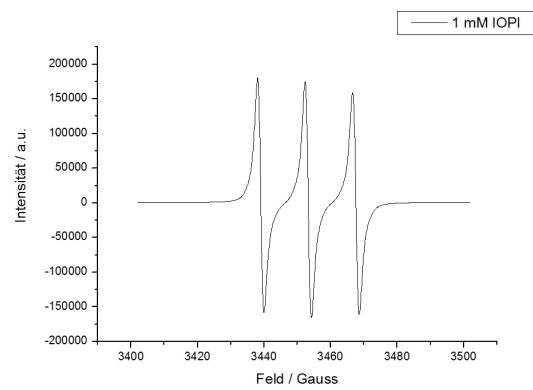
### 3.11.1 Raumtemperaturmessungen

Zunächst wurden EPR-Spektren von freiem MTS- und IOPI-Spinlabel aufgezeichnet (vgl. Abb. 3.46 und 3.47 auf Seite 70). Ein Vergleich der EPR-Spektren von MTS-gelabeltem SecB WT mit dem EPR-Spektrum von freiem MTS zeigt eine deutlich veränderte Spektriform (vgl. Abb. 3.48 auf Seite 70). Das Spektrum verbreitert sich aufgrund der eingeschränkten Bewegungsfreiheit der Spinlabel. Die Thiolgruppen der Cysteine an den Aminosäurepositionen 97 und 102 reagieren wesentlich schneller mit Spinlabelreagenzien als die an den Positionen 76 und 113 (Panse *et al.*, 2001). Jedoch kann aufgrund der insgesamt vier vorhandenen Cysteine keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, an welcher Aminosäureposition das Spinlabel genau gebunden ist. In der Literatur ist beschrieben, dass die Lösungsmittelzugänglichkeit der Cysteine an Position 97 in den Untereinheiten C und D sehr gut ist, die beste Zugänglichkeit besitzt jedoch das Cystein an Position 113 in Untereinheit C (Panse *et al.*, 2001). Die Beobachtungen verifizieren lediglich, dass durch die Spinlabelbindung an das SecB-Monomer dessen Rotationsfreiheit gegenüber dem freien Spinlabel eingeschränkt ist.

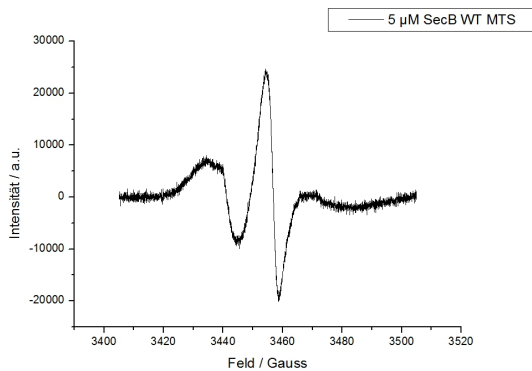
Weiterhin ist eine Verbreiterung des EPR-Spektrums von IOPI-gelabeltem SecB E90C gegenüber dem Spektrum von freiem IOPI zu erkennen (vgl. Abb. 3.49 auf Seite 70). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass auch das IOPI-Spinlabel durch die kovalente Bindung an die exponierte Aminosäureposition 90 im SecB Monomer (vgl. Abb. 3.6 auf Seite 33) sterisch gehindert ist und die Rotationsfreiheit leicht eingeschränkt ist. Der Vergleich zwischen den beiden Spektren von E90C-Mutante und dem SecB-WT-Protein zeigt jedoch eine schwächere Immobilisierung des Spinlabels an Aminosäureposition 90, was durch die exponierte Lage dieser Position gedeutet werden kann (vgl. Abb. 3.40 auf Seite 65).



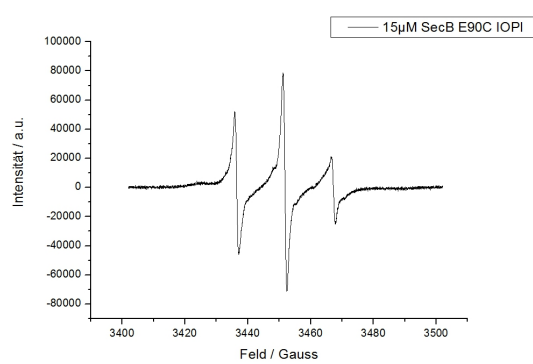
**Abb. 3.46:** Raumtemperatur-EPR-Spektrum von 1 mM MTS-Spinlabel-Lösung.



**Abb. 3.47:** Raumtemperatur-EPR-Spektrum von 1 mM IOPI-Spinlabel-Lösung.

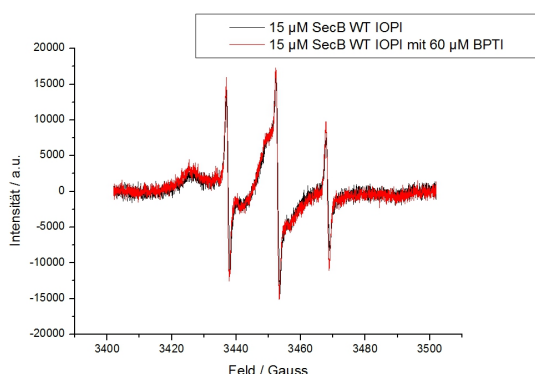


**Abb. 3.48:** Raumtemperatur-EPR-Spektrum von 5  $\mu$ M SecB WT gelabelt mit MTS.

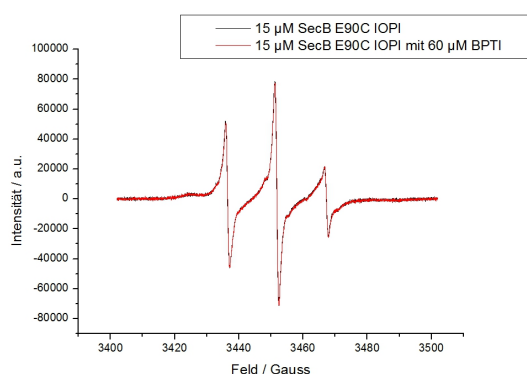


**Abb. 3.49:** Raumtemperatur-EPR-Spektrum von 15  $\mu$ M SecB E90C gelabelt mit IOPI.

Nachfolgend wurde der Einfluss einer möglichen Substratbindung an das SecB-Tetramer untersucht. Frühere Untersuchungen im Arbeitskreis (Panse *et al.*, 2001) wiesen nach, dass die Bindung des entfalteten Modellsubstrats BPTI eine Konformationsänderung des SecB-Tetramers hervorruft. Hierzu wurden EPR-Spektren von spinmarkiertem SecB WT-Protein sowie dem mutierten SecB E90C-Protein mit einem Überschuss an entfaltetem cam-BPTI vermessen. Die schwarzen Graphen in den Abbildungen 3.50 und 3.51 zeigen jeweils die Messungen der SecB-cam-BPTI-Komplexe im Vergleich zu den unkomplexierten SecB-Proteinen. Es ergaben sich in beiden Fällen keine Veränderungen der  $2A_{ZZ}$ -Werte, die auf eine weitere Einschränkung der Bewegungsfreiheit hätten schließen lassen bzw. auf eine Annäherung der Spinlabel in Bereiche, bei denen Spin-Spin-Wechselwirkungen zu erkennen sind.



**Abb. 3.50:** Raumtemperatur-EPR-Spektrum von 15  $\mu\text{M}$  SecB WT gelabelt mit IOPI ohne (schwarzer Graph) und mit 60  $\mu\text{M}$  cam-BPTI (roter Graph).

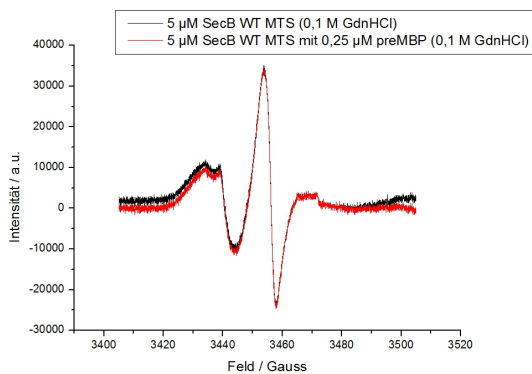


**Abb. 3.51:** Raumtemperatur-EPR-Spektrum von 15  $\mu\text{M}$  SecB E90C gelabelt mit IOPI ohne (schwarzer Graph) und mit 60  $\mu\text{M}$  cam-BPTI (roter Graph).

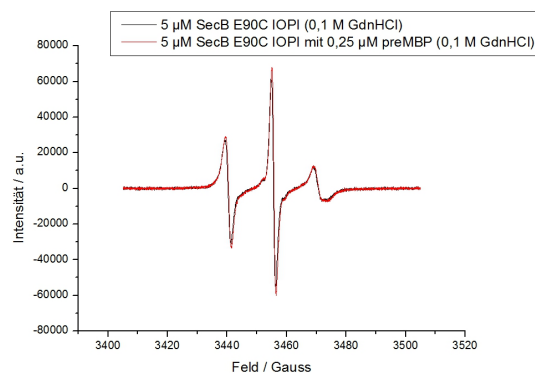
Neben dem Modells substrat BPTI wurden EPR-Messungen von SecB mit einem seiner natürlichen Substrate, dem Vorläufer des Maltosebindungsproteins (preMBP), durchgeführt. PreMBP besitzt ein Molekulargewicht von ca. 43 kDa und ist somit um ein Vielfaches größer als BPTI mit gerade mal 6,5 kDa. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass durch ein größeres Substrat auch eine größere Wechselwirkungsfläche zwischen SecB und preMBP zustande käme und somit Änderungen im EPR-Spektrum erkennbar wären. Die EPR-Spektren mit preMBP-Komplexierung sind in den Abbildungen 3.52 und 3.53 dargestellt.

PreMBP wurde in 3 M GdnHCl in einem bindungskompetenten Zustand gehalten. Um eine Entfaltung oder auch Teilentfaltung des Chaperons in Anwesenheit von preMBP durch eine zu hohe Konzentration an Denaturierungsmittel zu verhindern, wurde auf einen Substratüberschuss verzichtet. Die beiden roten Graphen weisen im Vergleich zum EPR-Spektrum der gelabelten Chaperone ohne Substrat (schwarze Graphen) jeweils keinerlei Änderung der  $2A_{ZZ}$ -Werte auf, die auf eine Einschränkung der Rotationsfreiheit der Spinlabel durch die Substratbindung an das Chaperon hätten schließen lassen. Selbst die Spinlabel am WT-Protein, welche aufgrund der Zugänglichkeit vermutlich an Aminosäureposition 97 oder 113 gebunden hatten (Panse *et al.*, 2001) und somit bereits im Eingang bzw. im Inneren der Substratbindungstasche liegen, zeigen keine Einschränkung ihrer Rotationsfreiheit infolge der Substratbindung. Durch den Überschuss an SecB könnten potenzielle Konformationsänderungen durch die Substratbindung im EPR-Signal überlagert sein, da möglicherweise zu wenige Chaperone das preMBP komplexiert hatten.

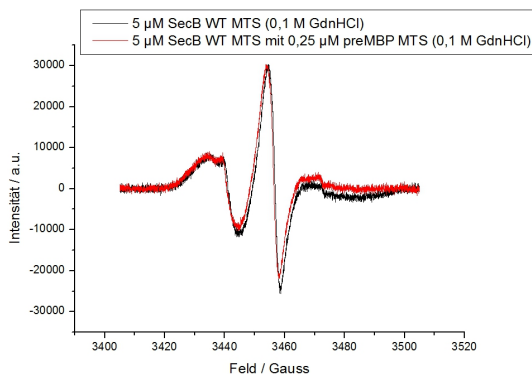
Weiterhin brachte auch die Untersuchung von gelabeltem Chaperon mit gelabeltem Substrat preMBP keine Veränderungen des EPR-Spektrums, so dass die Annahme, die Mobilität der Spinlabel würde durch die Komplexbildung eingeschränkt werden, nicht bestätigt werden kann (Abb. 3.54 und 3.55). Die Spinlabel am preMBP sowie am SecB scheinen so weit voneinander entfernt zu sein, dass keine dipolaren Wechselwirkungen zu beobachten sind.



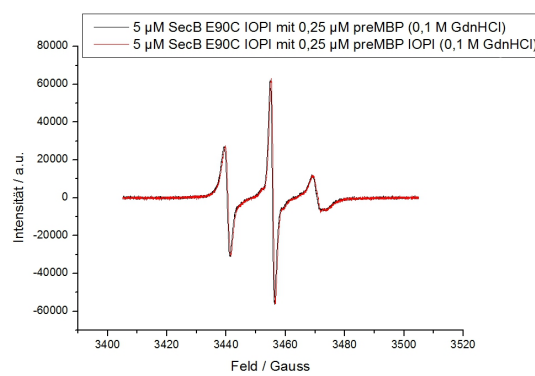
**Abb. 3.52:** Raumtemperatur-EPR-Spektrum von 5  $\mu\text{M}$  SecB WT gelabelt mit MTS in 0,1 M GdnHCl ohne (schwarzer Graph) und mit 0,25  $\mu\text{M}$  preMBP A312C (roter Graph).



**Abb. 3.53:** Raumtemperatur-EPR-Spektrum von 5  $\mu\text{M}$  SecB E90C gelabelt mit IOPI in 0,1 M GdnHCl ohne (schwarzer Graph) und mit 0,25  $\mu\text{M}$  preMBP A312C (roter Graph).



**Abb. 3.54:** Raumtemperatur-EPR-Spektrum von 5  $\mu\text{M}$  SecB WT gelabelt mit MTS in 0,1 M GdnHCl ohne (schwarzer Graph) und mit 0,25  $\mu\text{M}$  preMBP A312C gelabelt mit MTS (roter Graph).



**Abb. 3.55:** Raumtemperatur-EPR-Spektrum von 5  $\mu\text{M}$  SecB E90C gelabelt mit IOPI in 0,1 M GdnHCl ohne (schwarzer Graph) und mit 0,25  $\mu\text{M}$  preMBP A312C gelabelt mit IOPI (roter Graph).

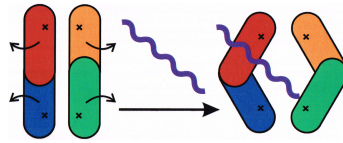
Wie in der Literatur beschrieben, muss die Substratbindungsstelle am SecB-Protein drei Kriterien erfüllen: Sie muss sich erstens auf der Oberfläche des Proteins befinden und zweitens einen hydrophoben Charakter besitzen. Frühere Untersuchungen haben bewiesen, dass die Bindung von SecB mit nicht-nativen Polypeptiden im Wesentlichen auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Zuletzt muss die Bindungsstelle sehr flexibel sein, da das Chaperon eine große Anzahl an Substraten binden kann (Xu *et al.*, 2000). All diese Annahmen wurden im Zusammenhang mit der Veröffentlichung der Kristallstruktur des SecB-Proteins von *E. coli* formuliert. Xu *et al.* beschreibt einen Peptidbindungskanal im Inneren des Tetramers, zwischen den beiden Dimeren (vgl. Abb. 3.6 auf Seite 33). Der Bindungskanal umfasst zwei Bereiche, einen tief im Inneren zwischen den beiden Dimeren und den zweiten an den Randbereichen des Bindungskanals in Richtung Oberfläche.

In der Literatur beschriebene EPR-Untersuchungen an gelabeltem SecB mit dem Vorläufer des Galactosebindungsproteins (preGBP) zeigen, dass in den Randbereichen des von Xu *et al.* beschriebenen Peptidbindungskanals eine Interaktion mit dem Liganden nachgewiesen werden kann (Crane *et al.*, 2005). Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen jedoch auch, dass der Bindungskanal zwar an der Ligandenbindung beteiligt ist, es jedoch auch einen Kontakt zwischen Chaperon und Substrat außerhalb des Peptidbindungskanals auf der Oberfläche des Tetramers gibt. Diese am preGBP gewonnenen Erkenntnisse konnten durch EPR-Messungen mit preMBP und dem SecB WT-Protein bzw. dem E90C-Protein bei Raumtemperaturmessungen nicht nachvollzogen werden. Hier konnte durch Substratzugabe keine Änderung des EPR-Spektrums nachgewiesen werden.

Frühere Abstandsmessungen im Arbeitskreis von Prof. Trommer an den Mutanten SecB C97 und E90C legten die Vermutung nahe, dass es durch die Substratbindung zu einem Auseinanderweichen der Dimere im Bereich des Peptidbindungskanals kommt, das im Inneren der Bindungstasche stärker in Erscheinung tritt als an den Randbereichen. Haimann entwickelte ein schematisches Modell der Substratbindung von SecB, in dem sie die Aufweitung des SecB-Tetramers nach der Komplexierung des Substrats mit dem Öffnen zweier Scheren vergleicht (vgl. Abb. 3.56) (Haimann *et al.*, 2011).

Die zwischenzeitlich im Arbeitskreis von Prof. Trommer der Technischen Universität Kaiserslautern generierte Mutante SecB C113 besitzt pro Monomer nur noch ein Cystein an der Aminosäureposition 113, welches sich tiefer in der Bindungstasche befindet als Aminosäure 97 (vgl. Abb. 3.6 auf Seite 33). Die Aufreinigung der SecB C113-Mutante über die Nickel-Affinitätschromatographie erfolgte – wie bereits in Kap. 3.4 auf Seite 42

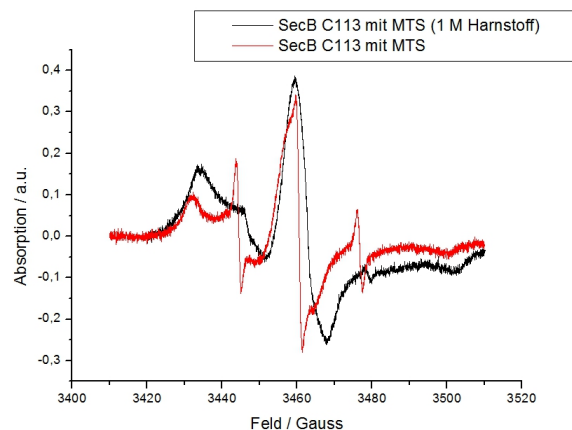




**Abb. 3.56:** Schematisches Modell der Substratbindung an das Chaperon SecB. Die Darstellung verdeutlicht die Aufweitung des SecB-Tetramers nach Bindung des Modellsubstrats BPTI. In rot und blau bzw. orange und grün sind jeweils die SecB-Dimere dargestellt, die schwarzen Kreuze markieren die Position des Spinlabels (Haimann *et al.*, 2011).

beschrieben – sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen. Die Anwesenheit von 1 M Harnstoff sollte für eine Teilentfaltung des Chaperons sorgen, um die Zugänglichkeit der Spinlabel an die Thiolgruppe zu verbessern. Die nachfolgend dargestellten EPR-Spektren verdeutlichen, dass das Spinlabeling nach beiden Isolierungsmethoden erfolgreich verlief. Dies deutet darauf hin, dass die Thiolgruppe an Aminosäureposition 113 auch im nicht (teil)entfalteten Protein eine hinreichende Zugänglichkeit für das Spinlabel besitzt. Weiterhin zeigen die Absorptionsspektren, dass die Rotationsfreiheit der Spinlabel im Vergleich zum freien Spinlabel durch die Bindung an das Chaperon unterschiedlich stark eingeschränkt ist. Durch die Teilentfaltung von SecB in Anwesenheit von 1 M Harnstoff zeigt sich eine größere Immobilisierung der Spinlabel im Vergleich zum nativ gefalteten SecB (vgl. Abb. 3.57). Durch diese Teilentfaltung des Chaperons wäre zu erwarten, dass die Beweglichkeit der Spinlabel deutlich zunimmt, da es zu einer Aufweitung der gesamten Proteinstruktur und damit auch zu einer potenziellen Aufweitung des Peptidbindungskanal kommt. Der Vergleich der Absorptionsspektren legt jedoch den Schluss nahe, dass durch die Teilentfaltung die Immobilisierung der Spinlabel zugenommen hat und sich der Peptidbindungskanal im Bereich der Aminosäureposition 113 verengt (vgl. Abb. 3.6 auf Seite 33). Weiterführende EPR-Untersuchungen an dieser Mutante wurden aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

**Abb. 3.57:** Raumtemperatur-EPR Spektrum von SecB C113 gelabelt mit MTS. Der schwarze Graph zeigt das über die denaturierende Nickel-Affinitätssäule in Anwesenheit von 1 M Harnstoff teilentfaltete Chaperon, der rote Graph das unter nativen Bedingungen isolierte Protein. Es ergeben sich folgende  $2A_{ZZ}$ -Werte: 67,8 G (nativ) und 68,5 G (teilentfaltet).



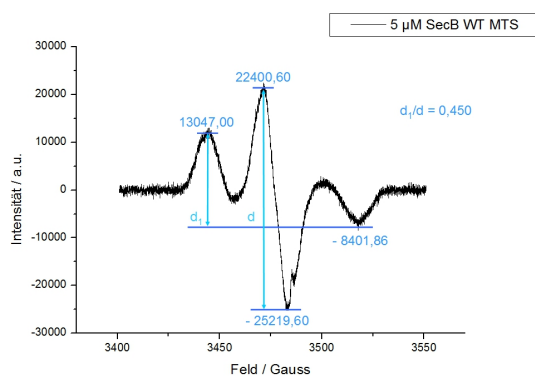
### 3.11.2 Tieftemperaturmessungen

Mit Hilfe der in Abschnitt 3.11.1 beschriebenen EPR-Untersuchungen bei Raumtemperatur konnte lediglich nachgewiesen werden, dass die Mobilität der Spinlabel durch die Bindung an das SecB WT- Protein (vgl. Abb. 3.48 auf Seite 70), das E90C-Protein (vgl. Abb. 3.49 auf Seite 70) sowie an das C113-Protein (vgl. Abb. 3.57 auf Seite 74) eingeschränkt ist. Ein Nachweis, dass die Komplexierung des Modellsubstrats BPTI oder des natürlichen Substrats preMBP eine weitere Einschränkung der Mobilität der Spinlabel am SecB hervorruft, gelang bei Raumtemperaturmessungen nicht. Weiterhin konnten durch die Bindung von spinmarkiertem preMBP an MTS-gelabeltem SecB WT- bzw. an IOPI-gelabeltem E90C-Protein keine dipolaren Wechselwirkungen verifiziert werden.

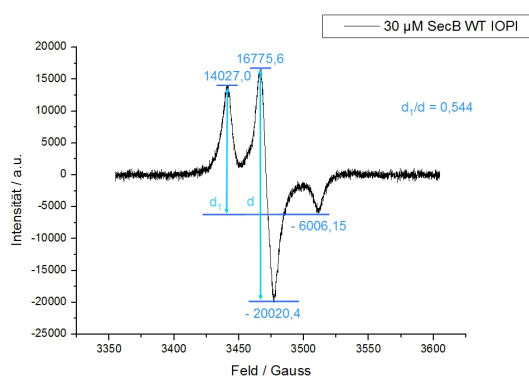
Mit Hilfe von *Continuous Wave*-Tieftemperaturmessungen können Abstandsmessungen zwischen zwei immobilisierten EPR-aktiven Zentren in einem Bereich von 6 bis 20 Å durchgeführt werden. Man nutzt dabei die veränderte Form der Absorptionsspektren mit zwei hinreichend nahen, paramagnetischen Zentren gegenüber solchen mit nur einem paramagnetischen Zentrum. Durch die dipolaren Wechselwirkungen erfährt das EPR-Spektrum eine Verbreiterung. Weiterhin kann aus dem Verhältnis der Höhe  $d_1$  des Tieffeldpeaks zur Höhe  $d$  des Mittelfeldpeaks eine erste Abschätzung des Abstands der beiden Spinlabel erfolgen. Das Verhältnis wird umso größer, je geringer die Distanz zwischen den Spinlabeln ist (Likhtenshtein, 1976). Bei einem Verhältnis  $d_1/d$  von  $\geq 0,40$  kann von einem Abstand der paramagnetischen Zentren von 20 Å oder weniger ausgegangen werden (Panse *et al.*, 2001). Das Tieftemperatur-EPR-Spektrum von MTS-markiertem SecB WT in Abbildung 3.58 weist ein Verhältnis  $d_1/d$  von 0,45 auf. Folglich liegen die beiden immobilisierten Spinlabel 20 Å oder weniger auseinander.

Die Lösungsmittelzugänglichkeit der Cysteine im SecB WT-Protein ist an den Aminosäurepositionen 97 und 113 am größten (Panse *et al.*, 2001), so dass die Wahrscheinlichkeit am höchsten ist, dass die Spinlabel an diesen Positionen binden. Die kurzen Abstände zwischen den beiden Cysteinen an Position 97 an den Untereinheiten A und C betragen 16 Å und zwischen B und D 14,5 Å. Die ebenfalls gut zugängliche Aminosäureposition 113 hat einen durchschnittlichen Abstand von ca. 11,7 Å. Auch das Tieftemperatur-EPR-Spektrum von IOPI gelabeltem SecB WT (vgl. Abb. 3.59) deutet mit einem Verhältnis  $d_1/d$  von 0,544 auf einen Abstand der Spinlabel von weniger als 20 Å hin. Das größere Verhältnis  $d_1/d$  im Vergleich mit dem Tieftemperatur-EPR-Spektrum von MTS-gelabeltem SecB WT deutet darauf hin, dass der Abstand der IOPI-Spinlabel noch gerin-

ger ist als bei den MTS-Spinlabeln. MTS reagiert in einer  $S_N2$ -Reaktion mit der Thiolgruppe eines Cysteins unter Ausbildung einer Disulfidbrücke (Reaktionsmechanismus siehe Abb. 3.43 auf Seite 67). Hierbei wird Methylsulfonsäure abgespalten. In der analogen Reaktion von IOPI mit der Thiolgruppe wird Jodwasserstoff abgespalten, der eine sehr viel kleinere Abgangsgruppe darstellt als Methylsulfonsäure. Der Vergleich der Molekülstrukturen von MTS und IOPI in den Abbildungen 3.41 und 3.42 auf Seite 66 zeigt, dass die ungepaarten Elektronen zweier MTS-Spinlabel durch die größere Abgangsgruppe weiter voneinander entfernt sind als die ungepaarten Elektronen zwischen benachbarten IOPI-Spinlabeln.



**Abb. 3.58:** Tieftemperatur-EPR-Spektrum von 5  $\mu\text{M}$  SecB WT gelabelt mit MTS bei 188 K. Der  $2A_{ZZ}$ -Wert beträgt 73,3 G.

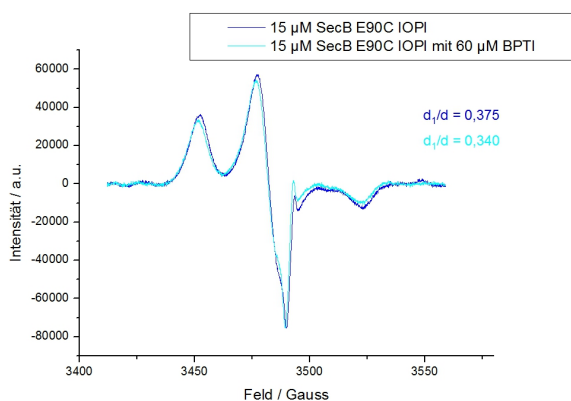


**Abb. 3.59:** Tieftemperatur-EPR-Spektrum von 30  $\mu\text{M}$  SecB WT gelabelt mit IOPI bei 188 K. Der  $2A_{ZZ}$ -Wert beträgt 69,4 G.

Das Tieftemperatur-EPR-Spektrum von IOPI-gelabeltem SecB E90C (vgl. dunkelblauer Graph in Abb. 3.60) liegt mit einem Verhältnis  $d_1/d$  von 0,375 außerhalb des Bereichs, in dem dipolare Wechselwirkungen auftreten. Die sich aus dem *Molecular Modeling* ergebenden Abstände zwischen den Cysteinen an den Aminosäurepositionen 90 liegen selbst mit dem kleinstmöglichen Abstand zwischen den Untereinheiten B und D bei 39,1 Å und damit weit außerhalb des Bereichs für Spin-Spin-Wechselwirkungen.

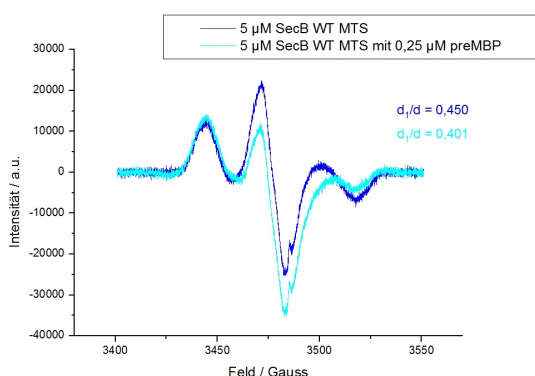
Nach Zugabe des ungelabelten Modellsubstrats BPTI zur IOPI-gelabelten Mutante E90C verringert sich das Verhältnis  $d_1/d$  von 0,375 auf 0,340 (vgl. Abb. 3.60). Bei einem Verhältnis  $d_1/d$  von  $\geq 0,40$  kann von einem Abstand der paramagnetischen Zentren von 20 Å oder weniger ausgegangen werden. Da die gemessenen Verhältnisse unter 0,4 liegen, muss davon ausgegangen werden, dass die paramagnetischen Zentren weiter als 20 Å voneinander entfernt liegen. Weiterhin zeigt sich eine minimale Verbreiterung des Absorptions-

spektrums durch die Substratzugabe. Der  $2A_{ZZ}$ -Wert steigt von 70,9 G auf 71,3 G, was auf Spin-Spin-Wechselwirkungen hindeutet. Da die EPR-Spektren recht ähnlich sind, die Verhältnisse  $d_1/d$  in einer vergleichbaren Größenordnung liegen und sich nur eine minimale Verbreiterung der EPR-Spektren zeigt, hat die Komplexbildung nicht zu einer nennenswerten Annäherung der Spinlabel in Bereiche für dipolare Wechselwirkungen geführt.

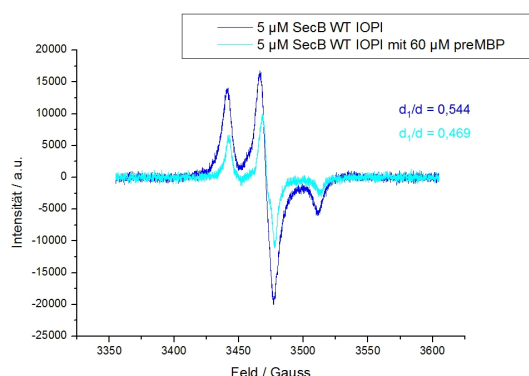


**Abb. 3.60:** Tieftemperatur-EPR-Spektrum von 15  $\mu\text{M}$  SecB E90C gelabelt mit IOPI und 60  $\mu\text{M}$  BPTI bei 188 K. Es ergeben sich folgende  $2A_{ZZ}$ -Werte: 70,9 G (unkomplexiert) und 71,3 G (komplexiert).

Die Zugabe von ungelabeltem preMBP A312C zum gelabelten Wildtyp-Chaperon führt im Falle des MTS-gelabelten Wildtyp-Proteins zu einer Abnahme des  $2A_{ZZ}$ -Werts von 73,3 G auf 71,3 G (vgl. Abb. 3.61). Der Vergleich der IOPI-gelabelten Spektren zeigt eine Verbreiterung des Absorptionsspektrums. Der  $2A_{ZZ}$ -Wert steigt von 69,4 G auf 71,6 G, was einen ersten Hinweis auf dipolare Wechselwirkungen darstellt (vgl. Abb. 3.62). Weiterhin verursacht die Substratzugabe in beiden Fällen eine Verringerung des Verhältnisses  $d_1/d$ . Im Falle von MTS-gelabeltem SecB WT verringert sich das Verhältnis von 0,450 durch die Substratzugabe auf 0,401, im Falle von IOPI-gelabeltem SecB WT von 0,544 auf 0,469. Diese Größenordnung lässt somit immer noch den Rückschluss auf dipolare Wechselwirkungen zwischen den Spinlabeln zu, jedoch haben sich die Spinlabel und folglich auch die Cysteine im Inneren der Bindungstasche durch die Substratbindung voneinander entfernt. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme von Haimann *et al.*, dass es durch die Substratbindung an SecB zu einer scherenartigen Aufweitung des Chaperons kommt (vgl. Abb. 3.56 auf Seite 74) (Haimann *et al.*, 2011).

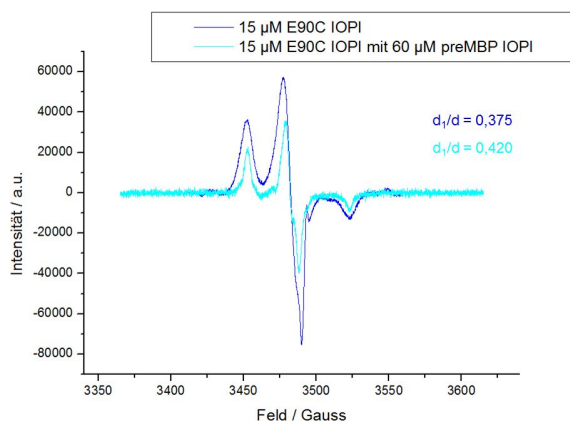


**Abb. 3.61:** Tieftemperatur-EPR-Spektrum von 5  $\mu\text{M}$  SecB WT gelabelt mit MTS und 0,25  $\mu\text{M}$  preMBP A312C bei 188 K. Es ergeben sich folgende  $2A_{ZZ}$ -Werte: 73,3 G (unkomplexiert) und 71,3 G (komplexiert).



**Abb. 3.62:** Tieftemperatur-EPR-Spektrum von 5  $\mu\text{M}$  SecB WT gelabelt mit IOPI und 60  $\mu\text{M}$  preMBP A312C bei 188 K. Es ergeben sich folgende  $2A_{ZZ}$ -Werte: 69,4 G (unkomplexiert) und 71,6 G (komplexiert).

Im Folgenden wurde die Komplexbildung von gelabeltem Chaperon E90C mit ebenfalls gelabeltem Substrat preMBP A312C untersucht (vgl. Abb. 3.63). Hierbei zeigen sich bei SecB E90C durch die Substratbindung deutliche Unterschiede im Absorptionsspektrum. Das zuvor aufgezeichnete Spektrum von SecB E90C gelabelt mit IOPI ohne Substrat hat ein Verhältnis  $d_1/d$  von 0,375 und zeigt keine dipolaren Wechselwirkungen. Durch die Komplexbildung mit dem gelabelten Vorläuferprotein preMBP steigt der  $d_1/d$ -Wert auf 0,420. Somit kann verifiziert werden, dass das preMBP mit SecB komplexiert ist und durch das zusätzliche Spinlabel an Aminosäureposition 312 am preMBP dipolare Wechselwirkungen entstehen. Da durch die Zugabe von ungelabeltem preMBP keine dipolaren Wechselwirkungen nachgewiesen werden konnten, kann somit belegt werden, dass sich durch die Komplexbildung das zusätzliche Spinlabel am preMBP an Position 312 in einem Abstand von 20 Å oder weniger zur Aminosäureposition 90 des SecB-Proteins befindet.



**Abb. 3.63:** Tieftemperatur-EPR-Spektrum von 15  $\mu\text{M}$  SecB E90C gelabelt mit IOPI und 60  $\mu\text{M}$  preMBP A312C gelabelt mit IOPI bei 188 K. Es ergeben sich folgende  $2A_{ZZ}$ -Werte: 70,9 G (unkomplexiert) und 69,5 G (komplexiert).

### 3.11.3 DEER-Messungen

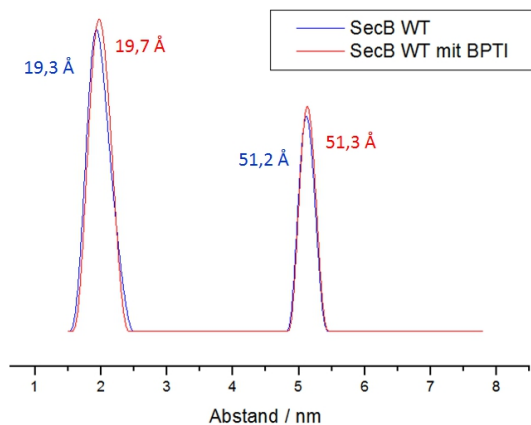
Mit Hilfe der auf Pulstechniken basierenden DEER-Messung (*Double Electron Electron Resonance*) ist es möglich, Abstände zwischen 20 Å und 80 Å zwischen Nitroxid-Radikalen zu bestimmen. Die durch *Molecular Modeling* der einzelnen SecB-Mutanten bestimmten Abstände zwischen den Cysteinen liegen größtenteils über 20 Å (vgl. Tab. 3.3 auf Seite 65), so dass durch diese Abstände verursachte Peaks dipolarer Wechselwirkung in zuvor durchgeführten, ungelulsten cw-EPR-Messungen nicht aufgelöst werden konnten. Die Abstände zwischen den Cysteinen an den Aminosäurepositionen 97 liegen im Bereich von 14,5 Å und 16 Å zwischen benachbarten Untereinheiten bzw. bei über 60 Å für die langen Distanzen. Der diagonale Abstand zwischen den Untereinheiten B und C beträgt 59 Å. Die Abstände zwischen den Cysteinen an der Aminosäureposition 113 liegen für den diagonalen Abstand zwischen den Untereinheiten A und D bei 17,5 Å. Alle anderen Abstände sind geringer.

Die im Folgenden dargestellten DEER-Messungen wurden am Max Planck Institut für Polymerforschung an der Universität Mainz im Arbeitskreis von Prof. Spiess aufgenommen. Das Gesamtprobenvolumen lag jeweils bei 80  $\mu\text{l}$ . Die Aufzeichnung der Daten der dipolaren Evolutionszeit erfolgte bei X-Band-Frequenzen von 9,2 bis 9,4 GHz unter Anwendung des 4-Puls DEER-Experiments (vgl. Abb. 1.17 auf Seite 27) bei einer Temperatur von 50 K (Pannier *et al.*, 2000).

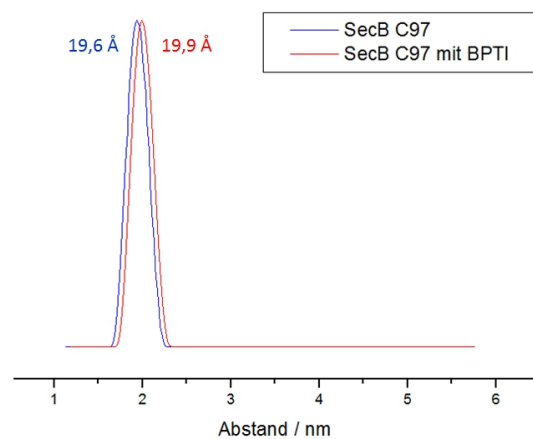
Durch das Vorhandensein von vier natürlichen Cysteinen beim Wildtyp-Chaperon kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, an welchen Cysteinen die Spinlabel am Chaperon gebunden sind. Die nach der DEER-Messung erhaltene Abstandsverteilung ist in Abbildung 3.64 dargestellt. Der ermittelte Abstand des substratfreien Proteins von

19,3 Å liegt am ehesten im Bereich der Cysteine an Aminosäureposition 97 zwischen den benachbarten Untereinheiten A und C, die ca. 16 Å voneinander entfernt sind. Eine andere Möglichkeit sind die gegenüberliegenden Cysteine an den Positionen 113 der Untereinheiten A und D mit einem Abstand von ca. 17,5 Å (vgl. Tab. 3.3 auf Seite 65). Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass die Spinlabel an verschiedenen Untereinheiten an unterschiedlichen Cysteinen sitzen, da die Zugänglichkeit der Cysteine 97 und 113 beim Wildtyp am besten ist. Die höhere Distanz von 51,2 Å lässt am ehesten die Vermutung zu, dass es sich hierbei um den diagonalen Abstand von 59 Å zwischen den Cysteinen der Untereinheiten B und C handelt.

Nach Substratzugabe ändert sich der große Abstand nicht signifikant (von 51,2 Å ohne BPTI auf 51,3 Å nach Substratzugabe), der kurze Abstand steigt jedoch von 19,3 Å auf 19,7 Å. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass es durch die Komplexbildung zu einem beidseitigen, scherenartigen Auseinanderziehen des Chaperons kommt (vgl. Abb. 3.56 auf Seite 74). Die geringe Abstandsvergrößerung deutet darauf hin, dass sich die Bindungstasche zwischen den beiden Dimeren durch die Substratbindung etwas geweitet hat.



**Abb. 3.64:** Abstandsverteilung der DEER-Messung von 80  $\mu\text{M}$  SecB WT gelabelt mit IOPI ohne (blau) und mit 26  $\mu\text{M}$  BPTI (rot) bei 50 K.



**Abb. 3.65:** Abstandsverteilung der DEER-Messung von 50  $\mu\text{M}$  SecB C97 gelabelt mit MTS ohne (blau) und mit 200  $\mu\text{M}$  BPTI (rot) bei 50 K.

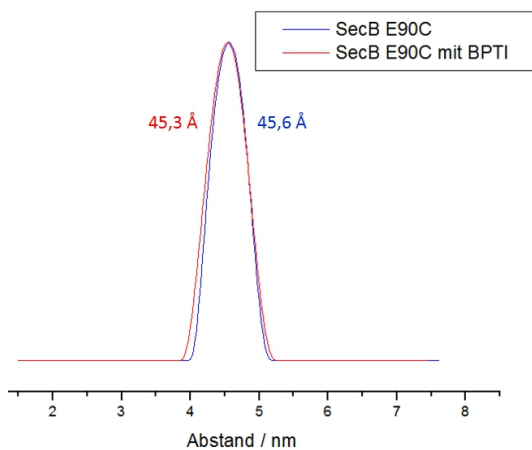
Die SecB-Mutante C97 besitzt lediglich ein Cystein an Position 97, so dass hier im Gegensatz zum Wildtyp klar definiert ist, wo das Spinlabel lokalisiert ist. Die erhaltene Abstandsverteilung von  $19,6 \text{ \AA}$  ( $\pm 1,58 \text{ \AA}$ ) im substratfreien Zustand (vgl. Abb. 3.65) zeigt eine gute Übereinstimmung mit der zuvor beschriebenen Abstandsverteilung des SecB WT-Proteins (Distanz der Spinlabel an Aminosäureposition 97:  $19,3 \text{ \AA}$  ohne Substrat) und bestätigt die Annahme, dass die Zugänglichkeit der Aminosäure 97 am höchsten ist und das Spinlabel dort gebunden hat. Der ermittelte Abstandsbereich von  $19,6 \text{ \AA}$  stammt von benachbarten Spinlabeln, die sich auf derselben Seite des Tetramers befinden, d.h. der Abstand zwischen den Untereinheiten A und C. Der mittels *Molecular Modeling* bestimmte Abstand zwischen den Cysteinen 97 der Untereinheiten B und D beträgt lediglich  $14,5 \text{ \AA}$  und liegt somit unterhalb der Detektionsgrenze für DEER-Messungen. Die Distanzen zwischen den Spinlabeln auf den gegenüberliegenden Seiten des Tetramers bzw. die diagonalen Abstände von ca.  $59 \text{ \AA}$  und mehr können durch die DEER-Messung nicht aufgelöst werden. Durch Substratbindung an die SecB-Mutante C97 kam es zu einer geringen Vergrößerung der Abstände von  $19,6 \text{ \AA}$  ( $\pm 1,58 \text{ \AA}$ ) auf  $19,9 \text{ \AA}$  ( $\pm 1,33 \text{ \AA}$ ). Die ermittelte Abstandsverteilung für die Mutante C97 bestätigt die zuvor ermittelten Abstände für das Wildtypprotein und verifiziert erneut die Hypothese der scherenartigen Aufweitung des Chaperons durch die Substratbindung.

Die Abstände zwischen den Cysteinen an Aminosäureposition 90 liegen im Bereich von  $39 \text{ \AA}$  und  $46 \text{ \AA}$  für die kurzen Distanzen zwischen benachbarten Untereinheiten, in Bereichen um  $75 \text{ \AA}$  und  $84 \text{ \AA}$  für die langen Distanzen und bei über  $72 \text{ \AA}$  bzw.  $83 \text{ \AA}$  für die diagonalen Entfernungen (vgl. Tab. 3.3 auf Seite 65). Abbildung 3.66 zeigt die ermittelte Abstandsverteilung nach der DEER-Messung der SecB-Mutante E90C mit und ohne BPTI. Es trat eine minimale Verkleinerung im Abstand von  $45,6 \text{ \AA}$  zu  $45,3 \text{ \AA}$  durch die Komplexierung von BPTI auf. Außerdem kam es zu einer geringen Aufweitung der Abstandsverteilung nach Substratzugabe.

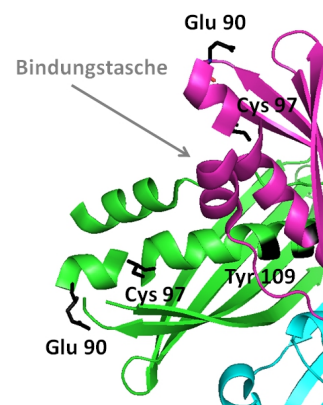
Die Glutaminsäure an Position 90 befindet sich am Beginn einer sehr gut zugänglichen und äußerst flexiblen  $\alpha$ -helicalen Region (vgl. Abb. 3.67). Bereits frühere cw-EPR-Messungen bei Raumtemperatur zeigten, dass die Beweglichkeit der Spinlabel an Aminosäureposition 90 aufgrund der exponierten Lage deutlich weniger eingeschränkt ist als an Position 97. Auch eine Zugabe von BPTI zeigte im Bereich von Position 90 keine Veränderung der  $2A_{ZZ}$ -Werte, die auf eine weitere Einschränkung der Bewegungsfreiheit hätten schließen lassen bzw. auf eine Annäherung der Spinlabel in Bereiche, bei denen Spin-Spin-Wechselwirkungen zu erkennen wären (vgl. Abb. 3.51 auf Seite 71). Auch



dieses Ergebnis der Abstandsmessung an Position 90 bestätigt das von Haimann *et al.* vorgeschlagene Modell zur Substratbindung, bei dem sie eine durch die Substratbindung doppelscherenartige Aufweitung des Chaperons in der Mitte zwischen den Dimeren postuliert und die Außenbereiche um die Aminosäureposition 90 kaum eine Abstandsänderung erfahren (Haimann *et al.*, 2011).



**Abb. 3.66:** Abstandsverteilung der DEER-Messung von 150  $\mu\text{M}$  SecB E90C gelabelt mit IOPI ohne (blau) und mit 150  $\mu\text{M}$  BPTI (rot) bei 50 K.



**Abb. 3.67:** Vergrößerter Ausschnitt des SecB WT-Proteins [Kristallstruktur-Datensatz PDB Code: 1QYN, RCSB PDB (Dekker *et al.*, 2003)]. Markiert sind die für die Abstandsmessungen relevanten Aminosäuren an Position 90 und 97.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Das homotetramere, cytosolische Chaperon SecB spielt eine entscheidende Rolle in der Proteintranslokation von *E. coli* beim Transport von Proteinen über die Cytoplasmamembran in den periplasmatischen Raum der Zelle. Es bindet währenddessen naszierende Polypeptide, hält diese in einem entfalteten, translokationskompetenten Zustand und transportiert sie zur Translokationsmaschinerie an die Cytoplasmamembran. *In vitro* wechselwirkt SecB mit einer Reihe von entfalteten Proteinen, beispielsweise dem *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI) oder *in vivo* mit dem Vorläuferprotein des Maltosebindungsproteins (preMBP). Frühere Untersuchungen lieferten Hinweise auf eine Konformationsänderung des Chaperons hervorgerufen durch eine Substratbindung des Modellsubstrats BPTI. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen dem natürlichen Substrat preMBP und SecB sowie auf weiteren Untersuchungen zur Konformationsänderung hervorgerufen durch die Substratbindung.

Die bisherige Aufreinigung der Chaperone gelang mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie in einer Reinheit von über 90 %, war jedoch sehr zeitaufwendig. Um die Aufreinigung zeiteffizienter zu gestalten und die Reinheit weiter zu steigern, erfolgte eine Umklonierung der verschiedenen SecB-Gene in pET20b(+)-Expressionsvektoren. Im Zuge dieser Einklonierung wurden die SecB-Sequenzen mit einer Thrombinschnittstelle und einem His-Tag fusioniert. Die anschließende Aufreinigung erbrachte eine Reinheit der Proteine von fast 100 %. Die erfolgreiche Abspaltung des His-Tags durch Thrombin wurde mittels SDS-PAGE und MALDI-ToF-Analyse bestätigt.

Um bei späteren Abstandmessungen mittels EPR-Spektroskopie Aussagen über konformelle Änderungen durch eine Substratbindung treffen zu können, war es unerlässlich zu wissen, an welcher Aminosäureposition des Chaperons das Spinlabel gebunden hatte. Ausgehend von der Mutante SecB C97, die nur noch ein einzelnes Cystein an Aminosäureposition 97 besitzt, wurde zunächst eine cysteinfreie Mutante generiert und in einem zweiten Mutationsschritt die gewünschten Cysteine an Aminosäureposition 109 (Mutante C109) bzw. 113 (Mutante C113) eingefügt.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete preMBP ist das Vorläuferprotein des Maltosebindungsproteins (MBP), welches im Periplasma von Gram-negativen Bakterien beispielsweise für den Maltosetransport verantwortlich ist, und ein natürliches Substrat von SecB darstellt. Die Isolierung mittels Affinitätschromatographie in Gegenwart von Mal-

tose erfordert eine anschließende Entfernung der Maltose aus dem preMBP-Maltose-Komplex, da das Chaperon das preMBP nur im maltosefreien Zustand bindet. Die Entfernung der Maltose konnte mittels Fluoreszenzmessung bestätigt werden.

Der Nachweis des preMBP-SecB-Komplexes gelangt mit Hilfe der HPLC unter Verwendung einer nach dem Größenausschlussprinzip trennenden Gelfiltrationssäule. Es konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 2 M GdnHCl ausreichend ist, um das preMBP vollständig zu entfalten und entfaltetes preMBP schneller von der Säule eluiert als rückgefaltetes. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Rückfaltung von preMBP durch Verringerung der GdnHCl-Konzentration von 3 M auf 0,1 M innerhalb weniger Sekunden abgeschlossen ist. Wird rückgefaltetes preMBP mit dem Chaperon gemischt und säulenchromatographisch untersucht, findet keine Komplexbildung statt und beide Proteine eluieren getrennt von der Säule. Wird jedoch das Chaperon vorgelegt, preMBP anschließend zugegeben und dieser Ansatz mittels HPLC untersucht, findet eine Komplexbildung statt und es erscheint nur ein Elutionspeak. Die anschließende Analyse mittels SDS-PAGE der Elutionsfraktionen bestätigte die Koelution von preMBP und SecB.

Ein weiterer Nachweis einer erfolgreichen Komplexbildung zwischen SecB und BPTI gelang mittels Fluoreszenzmessung. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch die Komplexbildung mit dem Chaperon die Umgebung der an das BPTI gebundenen Fluoreszenzlabel verändert und es infolgedessen zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums kommt.

Für die EPR-spektroskopischen Messungen wurden die jeweiligen SecB-Proteine mit den Spinlabeln MTS bzw. IOPI gelabelt. Ein Vergleich der MALDI-ToF Massenspektren von gelabeltem und ungelabeltem Protein bestätigte das quantitative Spinlabeling an jeder der vier SecB-Untereinheiten.

Die cw-EPR-Untersuchungen bei Raumtemperatur zeigten lediglich, dass die Beweglichkeit der MTS-Spinlabel am WT-Protein deutlich stärker eingeschränkt ist als am E90C-Protein, was durch die exponierte Lage der Position 90 gedeutet werden kann. Bei allen weiteren cw-EPR-Messungen bei Raumtemperatur waren die Spinlabel so weit voneinander entfernt, dass keine dipolaren Wechselwirkungen zu beobachten waren.

Die cw-EPR-Messungen des Wildtyp-Proteins bei einer Temperatur von ca. 180 K gaben erste Hinweise darauf, dass sich benachbarte Spinlabel in einem Abstand von weniger als 20 Å befinden. Der Vergleich mit den berechneten Abstandsdaten aus dem *Molecular Modeling* zeigte, dass es sich bei den gemessenen Entfernungen um die kurzen Abstände

zwischen den Cysteinen benachbarter Untereinheiten handeln muss. Die berechneten Abstandsdaten für die Mutante E90C zeigten bereits im Vorfeld, dass selbst der geringste Abstand der benachbarten Untereinheiten B und D im Bereich von 39,1 Å liegt und damit weit außerhalb des Bereichs für Spin-Spin-Wechselwirkungen. Das aufgezeichnete TT-EPR-Spektrum belegte diese Annahme. Durch die Bindung des Modellsubstrats BPTI konnte ebenfalls keine Annäherung der Spinlabel in Bereiche für dipolare Wechselwirkungen erzielt werden. Die aufgezeichneten TT-EPR-Spektren des gelabelten SecB Wildtyp-Proteins mit ungelabeltem preMBP zeigten ein verringertes Verhältnis  $d_1/d$  in Folge der Substratbindung. Durch die Komplexierung hatten sich die Spinlabel und folglich auch die Cysteine leicht voneinander entfernt. Aufgrund der insgesamt vier vorhandenen Cysteine konnte jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, an welcher Position die Spinlabel gebunden hatten.

Das gemessene TT-EPR-Spektrum von gelabeltem SecB E90C mit ebenfalls gelabeltem preMBP zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich zum Spektrum von gelabeltem E90C ohne Substrat. Durch die Substratbindung steigt das Verhältnis  $d_1/d$  von 0,375 auf 0,420 an. Das Spinlabel an Aminosäureposition 312 von preMBP befindet sich in einer Entfernung von maximal 20 Å zu einem Spinlabel am SecB.

Die DEER-Messungen mit der SecB-Mutante C97 ergaben Abstände von 19,3 Å und 51,2 Å, die aufgrund der Daten aus dem *Molecular Modeling* den kurzen und langen Abständen zwischen den Untereinheiten zugeordnet werden konnten. Durch die Bindung von BPTI zeigte sich eine doppelscherenartige Aufweitung zwischen den Dimeren im Bereich der Substratbindungstasche. Die kurzen Distanzen vergrößerten sich minimal, die langen Abstände blieben nahezu konstant. Auch die Abstandsdaten aus den Untersuchungen mit der Mutante E90C bestätigten die Aufweitung der Bindungstasche durch die Substratbindung.

Aus zeitlichen Gründen konnten mit den neu generierten SecB-Mutanten C109 und C113 keine DEER-Messungen durchgeführt werden, die einen deutlicheren Hinweis auf ein Auseinanderweichen des Tetramers durch die Substratbindung hätten zeigen können, da diese Aminosäuren tiefer im Substratbindungskanal liegen. Eine erste cw-EPR-Untersuchung bei Raumtemperatur mit der Mutante C113 belegte jedoch, dass dieses Cystein trotz seiner Lage im Bindungskanal gut für Spinlabel zugänglich ist. Ein weiterer interessanter Ansatz wäre die weitere Abstandsuntersuchung von spinmarkiertem Chaperon mit spinmarkiertem preMBP, die Aufschlüsse darüber bringen könnte, welche Substratbereiche an der Bindung zum Chaperon eine Rolle spielen.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bei der Durchführung der Versuche wurden folgende Geräte verwendet:

Autoklav:	Dampfkochtopf, Sitram Systec V-65
Brutschrank:	Memmert
Chromatographiehülsen:	BIO-RAD
Densitometer:	Elscript 400, Hirschmann
Dialyse:	VISKING Typ 8/32, 14.000 MWCO, Roth
Durchflussphotometer:	LKB 2138 Uvicord S mit LKB 3310 Recorder
EIA-Plattenreader:	BIO-RAD Typ 2550
Elektrophoresezubehör:	Mini-Protean 3 Cell, Bio-Rad SCIE-PLAS HU13, Bio-Rad Power Pac 300 und 3000, Bio-Rad Digitalkamera Olympus C5060 Wide Zoom Software: Beckman Doc-IT, Vers. 2.4.0
EPR-Spektrometer:	ELEXSYS E580cw/pulse, Bruker High-Q Cavity, Bruker Flexline Split-Ring Resonator ER4118XMS3, Bruker Software: Xepr, Bruker
Fluorometer:	Fluoro Max-2, ISA Jobin Y, Spex Software: Data Max
HPLC:	Solvent Module 125 mit Detector Module 168, Beckman Software: Karat32, Beckman
Inkubatoren:	Luftschüttler New Brunswick Innova 4000 Wasserschüttler Infors AG HTBTR 112
Konzentratoren:	Amicon Ultra 10.000 und 30.000 MWCO, Millipore Centriprep YM-10, Millipore Amicon 8050 mit YM-30, Millipore

---

Küvetten:	Plastibrand (Vis), Brand Suprasil (UV), Hellma
MALDI:	Ultraflex MALDI-ToF, Bruker Zip-Tip® Spitzen, Millipore
Peristaltikpumpen:	Biotec Pump P1, Pharmacia 2120, LKB
PCR:	Thermocycler GenAmp 2400, Applied Biosystems
Pipetten:	Transferpette S 20-1000 µl, Brand Pipetman 20-1000 µl, Gilson Reference 10 µl, Eppendorf Accu-Jet® Pro, Brand
pH-Meter:	pH 521, WTW
Probenwechsler:	Bromma 2111 Multirack, LKB
Säulen:	XK 26 und XK 50, Pharmacia
Schüttler:	Diffusions-Entfärb-Apparatur, Desaga
SpeedVac:	SpeedVac SC110, Savant Refrigerated Condensation Trap RT100, Savant
Sterilbank:	LaminAir HB2448, Heraeus
Sterilfilter:	0,45 µm-Filter und 0,22 µm-Filter, Millipore
Thermomixer:	Comfort Typ 5355, Eppendorf
Ultraschall:	Sonorex RK106, Bandelin Sonifier B-12, Branson
UV/VIS-Spektrometer:	DU-640, Beckman BioPhotometer, Eppendorf UV/Vis/NIR Lambda 900, Perkin Elmer Software: UV WinLab L800/L900 EIA-Plattenreader Typ 2550, Bio-Rad
Vortex:	Mixer, Retsch
Waagen:	1601-MP8-1 und 1413-MP8-1, Satorius
Zentrifugen:	J2-21 mit Rotoren JA-10, JA-14 und JA-20, Beckman Optima™LE-80k Ultrazentrifuge, Beckman Centrifuge 5415 C, Eppendorf Minifuge T, Heraeus

### 5.1.2 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Riedel-de-Haen, Seelze
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Steinheim
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
BCA-Reagenz A und B	Pierce, Weiskirchen
BPTI	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Butanol	Riedel-de-Haen, Seelze
Coomassie Brillant Blue R 250	Sigma, Steinheim
Cytochrom C	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Dimethylformamid (DMF)	Acros, New Jersey, USA
dNTP-Mix	Roche, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu, Gaiberg
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Chemikalienausgabe, TU Kaiserslautern
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
Guanidinhydrochlorid	Gerbu, Gaiberg
HEPES	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Iodacetamid	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
IPTG	Gerbu, Gaiberg
<i>iso</i> -Propanol	Chemikalienausgabe, TU Kaiserslautern
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Gerbu, Gaiberg
Luria-Bertani (LB)-Medium	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt

Maltose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
MTS	Prof. Dr. Kálmán Hidek, Universität Pécs, Ungarn
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat (DOC)	Sigma, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Riedel-de-Haen, Seelze
NDSB-201	Fluka, Steinheim
Nickelsulfat	Merck, Darmstadt
Page-Blue	Fermentas, Vilnius
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Pipes	AppliChem, Darmstadt
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
L(+)-Rhamnose Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Pierce, Weiskirchen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sinapinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	im AK vorhanden
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
2xYT-Medium	Roth, Karlsruhe

### 5.1.3 Säulen und Säulenmaterialien

Amylose	NEB, Frankfurt/Main
Nickel-NTA Agarose	Quiagen, Hilden
PD-10 Sephadex™GM25 M	GE Healthcare, München
Q-Sepharose <i>ff</i>	Altbestände der Fa. Knoll, Mannheim
Sephacryl-S200 HR	Altbestände der Fa. Knoll, Mannheim
Zorbax GF-250 (4 µm; 9,4 x 250 mm)	Agilent, Böblingen



### 5.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin über 22 µm steril filtrieren, Lagerung bei – 20 °C
5x Bradford-Reagenz	0,1 g Coomassie Brilliant-Blue G-250 50 ml Ethanol (50 %ig) 100 ml Phosphorsäure (85 %ig) ad 250 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
DTT-Stammlösung	0,1 M DTT in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , frisch ansetzen
GdnHCl-Stammlösung	8 M in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
IPTG-Stammlösung	0,5 M IPTG in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> über 22 µm steril filtrieren, Lagerung bei – 20 °C
Kanamycin-Stammlösung	100 mg/ml Kanamycin über 22 µm steril filtrieren, Lagerung bei – 20 °C
MTS-Stammlösung	0,1 M in Acetonitril, Lagerung bei – 80 °C im Dunkeln
PMSF-Stammlösung	0,1 M PMSF in <i>iso</i> -Propanol Aufbewahrung max. 4 Wochen bei – 20 °C
Rhamnose-Stammlösung	20% w/v über 22 µm steril filtrieren, Lagerung bei – 20 °C

### 5.1.5 *E. coli*-Stämme

Für die gentechnischen Arbeiten kamen folgende *E. coli*-Stämme zum Einsatz:

BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal dcm</i> (DE3)
KRX	[F', <i>traD36</i> , Δ <i>ompP</i> , <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , Δ( <i>lacZ</i> )M15] Δ <i>ompT</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> (Nal <sup>r</sup> ), <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), e14 <sup>-</sup> (McrA <sup>-</sup> ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ( <i>lac-proAB</i> ), Δ( <i>rhaBAD</i> )::T7 RNA Polymerase
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , ZΔM15, TN10 (Tet <sup>r</sup> )]

### 5.1.6 Enzyme

<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Dpn</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Nde</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-Polymerase	Agilent, Waldbronn
Pfu Turbo Polymerase	Agilent, Waldbronn
<i>Pst</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Promega, Mannheim
Thrombin	Novagen, Darmstadt
<i>Xho</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Für die durchgeführten Restriktionsreaktionen wurden die mitgelieferten Pufferlösungen verwendet.

### 5.1.7 Protein- und DNA-Marker

Die Zahlen geben die Größe der Proteine in kDa an.

Roti-Mark Prestained	200; 119; 66; 43; 29; 10; 14,5	Roth, Karlsruhe
Roti-Mark Standard	245; 123; 77; 42; 30; 25,4; 17	Roth, Karlsruhe

Folgender DNA-Marker der Fa. Fermentas wurde verwendet. Die Zahlen geben die Fragmentgröße in bp an.

Gene-Ruler <sup>TM</sup> 1kb DNA-Ladder	10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250
---	--

## 5.2 Allgemeine Arbeitsmethoden

### 5.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmungen

#### 5.2.1.1 UV/VIS-SPEKTROSKOPIE

Die UV/VIS-Spektroskopie eignet sich zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen. Sie basiert auf der UV-Absorption durch die Reste der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, in geringem Maße auch von Phenylalanin. Maßgeblich für die Messung ist das Absorptionsmaximum von Tryptophan bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Absorptionsmaxima der beiden anderen Aminosäuren liegen bei 275 nm bzw. 257 nm. Je nach Anteil dieser drei Aminosäuren in verschiedenen Proteinen, variieren auch die Absorptionen bei 280 nm. Auf der Basis eines durchschnittlichen molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  für diese drei Aminosäuren kann die Proteinkonzentration der Lösung in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm und einer Absorption bei 280 nm von 1,0 auf ca. 1 mg/ml bestimmt werden. Das Vorhandensein anderer Substanzen, die ebenfalls bei 280 nm absorbieren, stört dabei die Messung.

#### 5.2.1.2 BCA-TEST

Der BCA-Test dient zur quantitativen, photometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Mit einem Gemisch aus BCA (Reagenz A) und Kupfer(II)sulfat (Reagenz B) erhält man eine Lösung, die zur Proteinbestimmung verwendet werden kann. Die zweiwertigen Kupferionen werden quantitativ durch die oxidierbaren Gruppen im Protein zu einwertigen Kupferionen reduziert. Diese werden von BCA komplexiert und es entsteht ein violetter Farbstoff, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert werden kann (Smith, 1995). Verwendet wird das Testsystem der Fa. Pierce.

#### 5.2.1.3 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Ähnlich wie der BCA-Test beruht auch die Methode nach Bradford auf einer Farbreaktion. Der blaue Farbstoff Coomassie Brilliant-blue bindet in saurer Lösung an Proteine. Durch diese Anlagerung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Die Durchführung erfolgt gemäß der Anleitung des Praktikumsskripts zum Biochemischen Praktikum (Trommer, 2012).

## 5.2.2 Proteinaufkonzentrierung

### 5.2.2.1 AUFKONZENTRIERUNG MIT AMICON-KONZENTRATOREN

Mit Hilfe spezieller Membranen mit bekannter, definierter Porengröße, lassen sich Proteinlösungen aufkonzentrieren. Während der Zentrifugation gelangen Moleküle mit kleinerem Durchmesser als der Porendurchmesser durch die Membran, während größere Moleküle zurückgehalten und dadurch aufkonzentriert werden. Die Zentrifugationszeiten und -geschwindigkeiten werden den beliegenden Vorschriften entnommen.

### 5.2.2.2 PROTEINFÄLLUNG MIT TRICHOLORESSIGSÄURE (TCA-FÄLLUNG)

Dieses Verfahren beruht auf der Ausfällung von Proteinen mit Hilfe von Trichloressigsäure (TCA) und der anschließenden Wiederaufnahme in einem geringeren Volumen. Aufgrund der Irreversibilität ist diese Methode der Aufkonzentrierung lediglich in Verbindung mit der SDS-PAGE sinnvoll (Bensadoun und Weinstein, 1976).

#### **Benötigte Lösungen:**

DOC 0,15 g DOC  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

TCA 72 g TCA  
ad 100 g H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

#### **Durchführung:**

Die zu fällende Probe wird mit 10 % des Probenvolumens an DOC versetzt, kurz durchmischt und 10 min inkubiert. Anschließend werden 10 % des ursprünglichen Probenvolumens an TCA zugegeben und die Probe 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge wird der Überstand verworfen, das Gefäß ausgeklopft und das Pellet für die SDS-PAGE weiterverwendet.

## 5.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung und Charakterisierung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts. Dabei wird der Siebeffekt des Polyacrylamidgels zur Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht genutzt (Laemmli, 1970).

**Benötigte Puffer und Lösungen:**

Elektrophoresepuffer	28,8 g Glycin 6 g Tris 2 g SDS ad 2 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> pH 8,3
Trenngelpuffer	1 g SDS 45,5 g Tris ad 250 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> pH 8,8 (HCl)
Sammelgelpuffer	1 g SDS 15,5 g Tris ad 250 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> pH 6,8 (HCl)
APS-Lösung	1 g Ammoniumpersulfat ad 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Probenpuffer 4x	0,04 % Bromphenolblau 0,2 M DTT 40 % Glycerin 4 % SDS 0,18 M Tris-HCl pH 6,8 ad 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

**Zusammensetzung der Gele:**

Sammelgel 4,5 %	0,75 ml Acrylamidlösung 3 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 1,25 ml Sammelgelpuffer 7,5 µl TEMED 15 µl APS-Lösung
Trenngel 10 %	5 ml Acrylamidlösung 6,25 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 3,75 ml Trenngelpuffer 10 µl TEMED 25 µl APS-Lösung

---

Trenngel 12 %	6 ml Acrylamidlösung
	5,25 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
	3,75 ml Trenngelpuffer
	20 µl TEMED
	25 µl APS-Lösung
Trenngel 15 %	7,5 ml Acrylamidlösung
	3,75 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
	3,75 ml Trenngelpuffer
	20 µl TEMED
	25 µl APS-Lösung

**Durchführung:**

Verwendet werden Elektrophoresekammern von 10 x 7,5 x 0,2 cm. Die Elektrophorese läuft bei konstanter Spannung von 200 V, einer Stromstärke im Sammelgel von ca. 40 mA und im Trenngel von ca. 20 mA. Verwendet werden 4,5 %ige Sammelgele und je nach gewünschtem Trennbereich 10-, 12- oder 15 %ige Trenngele. Vor Beladung des Gels werden die Proben mit Probenpuffer für ca. 10 min gekocht. Proben mit zu geringer Proteinkonzentration werden zuvor mittels TCA-Fällung aufkonzentriert (siehe Kap. 5.2.2.2, Seite 93). Als Proteinmarker wird der Roti-Mark Standard der Fa. Roth, Karlsruhe verwendet. Die Färbung der Gele erfolgt mit PageBlue der Fa. Fermentas nach beiliegender Herstellervorschrift.

## 5.3 Gentechnische Arbeitsmethoden

### 5.3.1 Sterilisation von Geräten

Alle für gentechnische Arbeiten verwendeten Geräte und Materialien werden zunächst autoklaviert und alle nicht autoklavierbaren Gegenstände mit einem 70 %igen Wasser-Ethanol-Gemisch desinfiziert. Lösungen wie Antibiotika oder IPTG-Stammlösungen werden über einen 22 µm-Filter steril filtriert.

## 5.3.2 DNA-Isolierung

### 5.3.2.1 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA

Zur Isolierung von Plasmiden aus Übernachtskulturen von *E. coli* findet entweder das QIA-prep Spin Miniprep Kit der Fa. Quiagen oder das MAXXMORE Kit der Fa. AppliChem Verwendung. Die Isolierung erfolgt jeweils nach Herstellervorschrift. Beide Verfahren bestehen aus zwei Schritten. Im ersten Schritt, der alkalischen Lyse, werden zunächst die Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert. Anschließend wird das Lysat neutralisiert und auf eine hohe Salzkonzentration eingestellt, die für die Aufreinigung mit Hilfe der Silicagel-Membran notwendig ist. Im zweiten Schritt ermöglicht die hohe Salzkonzentration die selektive Adsorption der Plasmid-DNA an die Membran. Ein anschließender Waschschrift sorgt für die Entfernung von Salzen von der Membran. Letztlich wird die Plasmid-DNA mit beliebigem Puffer bzw.  $H_2O_{dd}$  von der Membran eluiert.

### 5.3.2.2 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Die mittels Endonucleasen verdauten DNA-Fragmente oder PCR-Produkte werden durch eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Zur Isolierung der Fragmente findet das NucleoSpin Extract II Kit der Fa. Macherey-Nagel Verwendung, die Aufarbeitung erfolgt nach mitgelieferter Herstellervorschrift.

### 5.3.2.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgt durch UV-Spektroskopie. Die Proben werden hierzu 1:100 mit  $H_2O_{dd}$  verdünnt und ihre Extinktionen bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Anhand des Verhältnisses der Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm lassen sich Rückschlüsse auf die Reinheit der Plasmid-DNA ziehen. Das Verhältnis soll mindestens bei 1,8 liegen.

## 5.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient *in vitro* zur Amplifikation beliebiger Nukleinsäureabschnitte. Die Methode macht sich die Eigenschaft der DNA-Polymerasen zu nutze, vorliegende DNA mit freiem 3'-OH-Ende zu verlängern. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird hierbei von zwei

synthetischen, sequenzspezifischen Oligonukleotiden, genannt Primer, vorgegeben. Diese Primer begrenzen zu beiden Seiten den zu verlängernden DNA-Abschnitt und bringen das für die Elongation durch die DNA-Polymerase erforderliche 3'-OH-Ende mit. Verwendet wird eine hitzestabile DNA-Polymerase.

**PCR-Ansatz (50 µl Volumen):**

5 µl	10x PfuTurbo® Puffer
10 ng	Template DNA
125 ng	<i>forward</i> Primer
125 ng	<i>reverse</i> Primer
1 µl	dNTPs (10 mM)
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
1 µl	PfuTurbo® Polymerase (2,5 U/µl)

**PCR-Zyklus:**

Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	
Primer-Annealing	55 °C	1 min	35x
Elongation	72 °C	5 min*	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Lagerung	4 °C	∞	

\* Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA. Laut Herstellerangaben vervielfältigt das Enzym 1 kb pro Minute bei Vektoren bis zu 10 kb.

### 5.3.4 Restriktionsverdau von DNA mittels Endonukleasen

Beim Restriktionsverdau werden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen an spezifischen Erkennungssequenzen geschnitten. Das Enzym erkennt eine spezifische Basensequenz und spaltet die Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge hydrolytisch. Durch den Restriktionsverdau entsteht aus einem Plasmid ein offenes, lineares DNA-Molekül, dessen Größe im Agarosegel bestimmt werden kann. Die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen der verschiedenen Restriktionsenzyme werden den Produktbeschreibungen des Anbieters entnommen.



### 5.3.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine unerwünschte Religation von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau zu verhindern, werden die freien 5'-OH-Enden der DNA-Fragmente mit Antarktischer Phosphatase dephosphoryliert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wird das Enzym 5 min bei 65 °C inaktiviert.

#### Dephosphorylierungsansatz:

26 µl DNA  
3 µl 10x Antarktische Phosphatase Puffer  
1 µl Antarktische Phosphatase

### 5.3.6 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mittels Ligase

Um durch Restriktionsverdau erhaltene, aufgereinigte DNA-Fragmente in einen entsprechenden Vektor einzuklonieren, wird die T4-DNA-Ligase verwendet. Die Ligation erfolgt nach Angaben des Herstellers, außer dass die Ligationszeit auf 16 h bei Raumtemperatur verlängert wird. Das Enzym wird anschließend durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

#### Ligationsansatz (20 µl Volumen):

50 ng Vektor, 100 ng Insert  
2 µl T4-DNA-Ligase Puffer  
1 µl T4-DNA-Ligase  
ad 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

### 5.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA. Die Detektion der DNA-Moleküle erfolgt hierbei mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid im UV-Licht. Es werden 0,9 %ige und 1,2 %ige Gele verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung von 120 V.

**Benötigte Puffer und Lösungen:**

10x TAE-Puffer	0,4 M Tris
	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA
	pH 7,4
6x Loading-Dye	50 % Glycerin (v/v)
	50 mM EDTA; pH 8,0
	0,25 % (w/v) Bromphenolblau

**5.3.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Alle PCR-Produkte und DNA-Fragmente werden mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits oder des QIAquick PCR Purification Kits nach Herstellervorschrift aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgt abweichend den Herstellerangaben mit Tris-Puffer.

**Benötigter Puffer:**

Tris-Puffer	2,5 mM Tris
	pH 8,0

**5.3.9 Transformation**

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und die gewünschte Menge des entsprechenden Plasmids (ca. 50 ng) zugegeben. Die XL1-Blue-Zellen werden anschließend 30 min, die KRX-Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein 90 s langer Hitzeschock bei 42 °C im Falle der XL1-Blue-Zellen und ein 20 s langer Hitzeschock im Falle der KRX-Zellen. Anschließend werden die Zellen auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium erfolgt eine einstündige Inkubation bei 37 °C und 150 rpm im Schüttler. Der Erfolg der Transformation wird durch eine Wachstumskontrolle auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum kontrolliert. Hierzu werden 200 µl der transformierten Zellen ausgestrichen. Es folgt eine Inkubation der Agarplatten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank. Die am nächsten Tag gewachsenen Kolonien tragen das zugesetzte Plasmid.

### 5.3.10 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese ermöglicht gezielte Basenaustausche der DNA. Erforderlich sind kurze Oligonukleotide, sog. Primer, die die gewünschten Punktmutationen mittig enthalten. Alle verwendeten Primer werden mit dem Programm *Clone Manager Suite 7* entworfen. Ausgehend von der SecB Wildtyp-Sequenz (PDB Code: 1QYN, RCSB PDB) werden alle Mutationen nacheinander eingefügt und alle Mutationsschritte durch Sequenzierung verifiziert. Die PCR wird nach dem Pipettierschema und den Zeitvorgaben aus Kap. 5.3.3 auf Seite 96 durchgeführt. Im Anschluss an die PCR erfolgt der Verdau der parentalen, unmutierten DNA in Gegenwart von 1 µl *DpnI* (10 U/µl) durch einstündige Inkubation bei 37 °C. Die Inaktivierung des Enzyms wird 20 min bei 80 °C durchgeführt. Anschließend erfolgt die Transformation in ultrakompetente Zellen nach Anleitung in Kap. 5.3.9 auf Seite 99.

### 5.3.11 Der Expressionsvektor pET20b(+)

Zur Expression dient der Vektor pET20b(+) der Fa. Novagen (vgl. Abb. A.3, Seite 129). Dieser trägt eine Ampicillin-Resistenz sowie C-terminal einen 6x His-Tag. Über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* werden die jeweiligen SecB-Gene in die *Multi Cloning Site* inkloniert.

### 5.3.12 Oligonukleotide

Zur Herstellung der jeweiligen pET20b(+)-Plasmide mit den entsprechenden SecB-Mutanten finden die in der folgenden Tabelle dargestellten, synthetischen Oligonukleotide Verwendung. Alle Primer werden mit Hilfe des Computerprogramms *Clone Manager Suite 7* entworfen und von der Fa. Operon synthetisiert.

**Tab. 5.17:** Übersicht der verwendeten synthetischen Oligonukleotide.

SecB for	5'-CACCCATATGTCAGAACAACAACACTGAAATGACTTTTCAGATCC-3'
SecB rev	5'-CACCTCGAGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCCGCTGCTGGCATCCTGATGTTCTTCAGTACCTTCGCCAG-3'
SecB C97A for	5'-GTTCCCGTATGCTCGTGAGTGCATCACCAGCATGGTATCC-3'
SecB C97A rev	5'-GGATACCATGCTGGTGATGCACTCACGAGCATACTGGAAC-3'
SecB A102C for	5'-GAGCATACTGCCCGAACATTCTG-3'
SecB A102C rev	5'-CAGAAATGTTCCGGGCAGTATGCTC-3'
SecB Y109C for	5'-ATTCTGTTCCCGTGTGCTCGTGAGTG-3'
SecB Y109C rev	5'-CACTCACGAGCACACGGGAACAGAAT-3'
SecB A113C for	5'-GTATGCTCGTGAGTGCATCACCAG-3'
SecB A113C rev	5'-CTGGTGATGCACTCACGAGCATACT-3'

## 5.4 Biochemische Arbeitsmethoden

### 5.4.1 Herstellung ultrakompetenter Zellen

Um eine möglichst hohe Transformationsrate zu erreichen, werden die *E. coli*-Zellen in Gegenwart von Manganchlorid kompetent gemacht (Inoue *et al.*, 1990).

#### Benötigter Puffer:

TB-Puffer	10 mM Pipes
	15 mM Calciumchlorid
	55 mM Manganchlorid
	250 mM Kaliumchlorid

#### Durchführung:

Alle Bestandteile außer  $MnCl_2$  werden gemischt und mit KOH auf einen pH-Wert von 6,7 eingestellt. Anschließend wird  $MnCl_2$  zugegeben und die Lösung durch einen 0,45  $\mu$ m-Filter steril filtriert. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

Es wird ein Verdünnungsausstrich auf einer 2xYT-Agarplatte angelegt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden zehn bis zwölf Kolonien mit einer Impföse von der Agarplatte entnommen und zunächst, in Abweichung zur Vorschrift, in 20 ml LB-Flüssigmedium überführt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Schüttler. Am folgenden Tag werden 5 ml der Übernachtskultur in 250 ml LB-

Flüssigmedium überführt und bei 18 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Es folgt eine 10-minütige Inkubation auf Eis, bevor die Zellen 10 min bei 2500 g und 4 °C abzentrifugiert werden. Das Pellet wird in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und nochmals 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut 10 min bei 2500 g und 4 °C abzentrifugiert und in 20 ml TB-Puffer gelöst. Unter leichtem Schütteln erfolgt die DMSO-Zugabe bis zu einer Endkonzentration von 7 %, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation auf Eis, bevor die Zellen in 50 – 150 µl Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert werden.

#### **5.4.2 Wachstumsmessungen**

Das Bakterienwachstum kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt werden. Das Licht wird beim Durchtritt durch die Suspension gestreut, wobei die Streuung von der Anzahl der enthaltenen Bakterien und ihrer Größe abhängt. Als Nullwert (Blank) dient die optische Dichte (OD) von nicht angeimpften Medium. Die Trübung der Flüssigkultur ist nur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 linear proportional zur Zellzahl. Liegt der Wert oberhalb, wird die Suspension mit LB-Medium verdünnt.

#### **5.4.3 Anlegen von Glycerinkulturen**

Unter sterilen Bedingungen werden 250 µl 80 %iges Glycerin zu 750 µl der entsprechenden Übernachtskultur gegeben, gemischt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei – 80 °C.



## 5.5.2 Chromatographische Aufreinigung von SecB

### 5.5.2.1 IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE

Im ersten Schritt der chromatographischen Aufreinigung von SecB wird Q-Sepharose *ff* verwendet. Alle Aufreinigungsschritte werden mit einem Durchflussphotometer dokumentiert. Die verwendete Säule hat einen Durchmesser von 12 cm und eine Höhe von 30 cm, die Flussrate beträgt 3 ml/min. Vor der ersten Benutzung wird das Säulenmaterial nach dem CIP-Protokoll (Fa. Amersham Biosciences Q-Sepharose Fast Flow instructions) gereinigt und mit mindestens fünf Säulenvolumen Bindungspuffer äquilibriert. Auf die vorbereitete Säule können maximal 2,5 % des Bettvolumens an Zellysat aufgetragen werden. Anschließend wird mit Waschpuffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder konstant ist. Die anschließende Elution des gewünschten Proteins erfolgt mit Elutionspuffer. Die proteinhaltigen Fraktionen werden vereinigt und aufkonzentriert. Nach der Konzentrationsbestimmung erfolgt die Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### Benötigte Puffer:

Bindungspuffer	200 mM Natriumchlorid 20 mM Tris pH 7,4
Waschpuffer	300 mM Natriumchlorid 20 mM Tris pH 7,4
Elutionspuffer	400 mM Natriumchlorid 20 mM Tris pH 7,4

### 5.5.2.2 GRÖSSENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE

Zur weiteren Aufreinigung von SecB wird eine Sephacryl S-200 HR-Säule mit einem Durchmesser von 4 cm sowie einer Höhe von 80 cm verwendet. Die Flussrate beträgt 1 ml/min. Vor der ersten Benutzung wird das Säulenmaterial nach dem CIP-Protokoll der Fa. Amersham Biosciences (Sephacryl S-200 High Resolution Instructions) gereinigt und mit Säulenpuffer äquilibriert. Auf die gereinigte Säule können maximal 2,5 % des Bettvolumens an Probenvolumen aufgetragen werden. Das Protein wird mit Säulenpuffer eluiert,

die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und aufkonzentriert. Die Reinheitskontrolle der Elutionsfraktionen erfolgt mittels SDS-PAGE. Nach der Konzentrationsbestimmung wird das Protein aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Benötigter Puffer:**

Säulenpuffer 150 mM Natriumchlorid  
20 mM Tris  
pH 7,4

**5.5.2.3 NATIVE NICKEL-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE**

3,5 ml Zellysate werden mit 1,5 ml Nickel-NTA-Agarose gemischt und für 2 h unter leichtem Schütteln bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Während dieser Zeit erfolgt die Bindung des His-Tags an das Säulenmaterial. Das Gemisch wird anschließend in eine kleine Chromatographiehülse aus Polyethylen gefüllt und der Durchfluss gesammelt. Der Waschschrift erfolgt zweimal mit je 4 ml Waschpuffer. Hierbei erfolgt die Abtrennung aller unspezifisch an das Säulenmaterial gebundenen Proteine. Die einzelnen Waschfraktionen werden für die spätere Analyse gesammelt. Das His-Tag-Protein wird viermal mit jeweils 0,5 ml Elutionspuffer eluiert und die Fraktionen ebenfalls einzeln aufgefangen. Die Analyse aller gesammelten Säulenfraktionen erfolgt mittels SDS-PAGE. Die Fraktionen, die das His-Tag-Protein enthalten, werden vereinigt.

**Benötigte Puffer:**

Waschpuffer 50 mM Natriumdihydrogenphosphat  
300 mM Natriumchlorid  
20 mM Imidazol  
pH 7,4 (NaOH)

Elutionspuffer 50 mM Natriumdihydrogenphosphat  
300 mM Natriumchlorid  
500 mM Imidazol  
pH 7,4 (HCl)



#### 5.5.2.4 DENATURIERENDE NICKEL-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

2 ml Zellysate werden für ein bis zwei Stunden unter leichtem Schütteln in Gegenwart von 1 M Harnstoff bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1 ml Ni-NTA-Agarose und es folgt eine einstündige Inkubation unter gleichen Bedingungen. Der Ansatz wird in eine verschlossene Chromatographiehülse überführt und gewartet, bis das Säulenmaterial sich abgesetzt hat. Nach dem Öffnen des Verschlusses wird der Durchfluss gesammelt. Der anschließende Waschschrift erfolgt mit 4 ml Waschpuffer. Hierbei verlassen unspezifisch gebundene Proteine das Säulenmaterial. Die erste Elution erfolgt mit 2 ml Elutionspuffer 1 bei einem pH-Wert von 5,9, die zweite Elution mit 2 ml Elutionspuffer 2 bei einem pH-Wert von 4,5. Alle proteinhaltigen Fraktionen werden zur Analyse mittels SDS-PAGE gesammelt.

##### **Benötigte Puffer:**

Waschpuffer	100 mM Natriumdihydrogenphosphat 10 mM Tris 1 M Harnstoff pH 6,3
Elutionspuffer 1	100 mM Natriumdihydrogenphosphat 10 mM Tris 1 M Harnstoff pH 5,9
Elutionspuffer 2	100 mM Natriumdihydrogenphosphat 10 mM Tris 1 M Harnstoff pH 4,5

#### 5.5.2.5 DIALYSE VON SEC B

Zur Entfernung des Imidazols, welches die spätere Thrombinspaltung stören würde, werden alle SecB-haltigen Fraktionen dialysiert. Der Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 14 kDa wird zunächst in  $H_2O_{dd}$  eingelegt. Um ein Ausflocken der Proteine während der Dialyse zu vermeiden, wird das Probenvolumen erhöht und das Protein mit wenig Dialysepuffer verdünnt. Die Dialyse erfolgt zweimalig über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren gegen jeweils 5 l Dialysepuffer.

**Benötigter Puffer:**

Dialysepuffer 200 mM Natriumchlorid  
20 mM Tris  
pH 7,4 (HCl), einstellen bei 4 °C

**5.5.2.6 ABSPALTUNG DES HIS-TAGS VON SEC B MITTELS THROMBIN**

Die Abspaltung des 6x His-Tags erfolgt mittels Thrombin-Kit der Fa. Novagen. Thrombin ist eine Endoprotease, die spezifisch an die Aminosäuresequenz LeuValProArg↓GlySer bindet und die Peptidbindung vor dem Glycin spaltet. Das Dialysat wird zunächst über einen 45 µm-Filter steril filtriert und die Konzentration mittels BCA-Test bestimmt. Anschließend wird eine Probe ungespaltenes SecB für die spätere Analyse mittels SDS-PAGE zurückgehalten und die Lösung nach Herstellervorschrift mit 10x Cleavage-Puffer versetzt und pro Milligramm Protein 1 U Thrombin (1,44 U/µl) zum Ansatz gegeben. Die Inkubation erfolgt unter leichtem Schütteln 16 Stunden bei Raumtemperatur. Der abgespaltene His-Tag und das Thrombin werden anschließend mittels Mikrokonzentration (Ausschlussgröße 50.000 kDa) herausgewaschen, indem die Lösung mehrere Male zentrifugiert wird und erneut mit Dialysepuffer, der 1 mM PMSF enthält, aufgefüllt wird. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels BCA-Test und die Kontrolle der Abspaltung des His-Tags mittels SDS-PAGE. Die Lagerung des Proteins findet bei – 80 °C statt.

**5.6 Expression und Isolierung von preMBP****5.6.1 Expression von preMBP**

Aus einer BL21(DE3)-Glycerinkultur wird ein Verdünnungsausstrich auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte angelegt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wird unter sterilen Bedingungen mit einem Zahnstocher eine einzelne Kolonie gepickt und damit eine Übernachtskultur mit 20 ml ampicillinhaltigem LB-Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37 °C im Schüttler bei 150 rpm. Ausgehend von der Übernachtskultur wird eine *large-scale* Kultur mit 750 ml LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm im Schüttler inkubiert. Zur Wachstumskontrolle wird stündlich die optische Dichte bei 600 nm des Mediums gemessen. Bei einem Wert zwischen 1 und 1,2 erfolgt die Induktion mit 130 µM IPTG. Anschließend

wird die Kultur über Nacht unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Am folgenden Tag wird das Zellwachstum gestoppt, indem die Kulturen 10 min in Eiswasser gestellt werden. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 6.370 g (6.000 rpm, Rotor JA-10, Beckman) und 4 °C erfolgt die Abtrennung der Zellen vom Nährmedium. Das erhaltene Zellpellet wird in 25 ml Resuspendierungspuffer gewaschen und schließlich in 20 ml Puffer gelöst. Der Zellaufschluss erfolgt mittels Ultraschall im Eisbad (12x 10 s Puls, 20 s Pause). Die anschließende Zentrifugation bei 18.900 g (12.500 rpm, Rotor JA-20, Beckman, 4 °C, 30 min) trennt das Lysat von den Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen ab. Zur Entfernung von Schwebstoffen wird das Lysat vor dem Säulengang in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (400.000 g, 4 °C, 30 min). Die Lagerung des Überstands erfolgt nach dem Schockgefrieren bei – 80 °C.

**Benötigter Puffer:**

Resuspendierungspuffer 25 mM Natriumchlorid  
20 mM Tris  
1 mM PMSF  
pH 7,4

**5.6.2 Chromatographische Aufreinigung von preMBP**

Die Aufreinigung von preMBP erfolgt bei 4 °C über eine Amylose-Säule mit einem Durchmesser von 2,5 cm und einer Höhe von 15 cm. Die Säule wird mit 15 ml Amylose beladen, die Flussrate auf 1 ml/min eingestellt und die Elution mit Hilfe eines Durchflussphotometers kontrolliert. Das Säulenmaterial wird mit acht Säulenvolumen Bindungspuffer äquilibriert und anschließend mit 7,5 ml des Zellysats beladen. Der Waschschrift erfolgt so lange, bis alle ungebundenen Proteine von der Säule gewaschen sind. Das preMBP wird mit Elutionspuffer eluiert. Die gewünschten Fraktionen werden zunächst mit Hilfe der SDS-PAGE auf ihre Reinheit kontrolliert, vereinigt und aufkonzentriert. Nach der Konzentrationsbestimmung wird das isolierte Protein bei – 80 °C gelagert.

**Benötigte Puffer:**

Resuspendierungspuffer 25 mM Natriumchlorid  
20 mM Tris  
1 mM PMSF  
pH 7,4

---

Bindungspuffer	25 mM Natriumchlorid 20 mM Tris 1 mM PMSF pH 7,4
Waschpuffer	25 mM Natriumchlorid 20 mM Tris pH 7,4
Elutionspuffer	25 mM Natriumchlorid 20 mM Tris 10 mM Maltose-Monohydrat pH 7,4

### 5.6.3 Entfernen der Maltose aus dem preMBP-Maltose-Komplex

Der preMBP-Maltose-Komplex inkubiert für zwei Stunden in 3 M Guanidinhydrochlorid bei Raumtemperatur. Während dieser Denaturierung verlässt die Maltose das Protein. Mit Hilfe einer mit Säulenpuffer äquilibrierten PD-10 Säule wird die Maltose aus dem Proteingemisch entfernt, indem 2,5 ml der Probe aufgetragen und mit 3,5 ml Säulenpuffer eluiert werden. Alle proteinhaltigen Fraktionen werden vereinigt und aufkonzentriert. Nach der Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Test findet nach dem Aliquotieren und Schockgefrieren die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  statt.

#### Benötigte Puffer und Lösungen:

Guanidinhydrochlorid-Lösung	8 M
Säulenpuffer	3 M Guanidinhydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 20 mM Tris pH 7,4

### 5.6.4 Fluoreszenzmessung von preMBP

Zur Bestimmung der Anregungswellenlänge für folgende Fluoreszenzmessungen werden zunächst die Absorptionsmaxima von preMBP mit und ohne Maltose im UV/Vis-Spektrometer bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  bestimmt (Wellenlängenbereich: 800 – 210 nm; Messintervall

0,1 nm; Integrationszeit: 0,2 s; Küvettschichtdicke: 1 cm). Das Absorptionsmaximum liegt bei 279 nm. Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgt die Anregung bei einer Wellenlänge von 279 nm in einem Messbereich von 290 – 500 nm (Spaltbreite 2,5 nm; Schrittweite 0,2 nm; Integrationszeit 0,1 s für das maltosehaltige und 0,2 s für das maltosefreie preMBP).

## 5.7 Expression und Isolierung von all-Ala-BPTI

### 5.7.1 Aufzucht und Lyse der Zellen

Die Zellaufzucht erfolgt in Analogie zur Aufzucht und Lyse von SecB (vgl. Kap. 5.5.1, Seite 103). Nach der Zelllyse mittels Ultraschall befindet sich das gewünschte Protein jedoch im Gegensatz zum SecB, welches als lösliches Protein im Überstand vorkommt, in *Inclusion Bodies* im Zellpellet.

### 5.7.2 Isolierung aus den *Inclusion Bodies*

Der Zentrifugationsüberstand mit allen löslichen Proteinen wird verworfen. Durch Inkubation des Zellpellets mit 15 ml Denaturierungspuffer über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln erfolgt der Aufschluss der *Inclusion Bodies*. Am Folgetag ist die zunächst trübe Suspension klar geworden und wird nun 40 min bei 4 °C und 130.000 g zentrifugiert, um Zelltrümmer und Schwebstoffe abzutrennen. Das all-Ala-BPTI liegt nun im Überstand vor. Die Lagerung erfolgt nach dem Schockgefrieren in Aliquots bei – 80 °C.

#### Benötigter Puffer:

Denaturierungspuffer    6 M Guanidinhydrochlorid  
                                  200 mM Natriumchlorid  
                                  20 mM Tris  
                                  5 % Glycerin  
                                  pH 7,4 (HCl)

### 5.7.3 Nickel-Affinitätschromatographie

3 ml Zelllysate werden mit 1,5 ml Ni-NTA-Agarose gemischt und für 2 h unter leichtem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Das Gemisch wird anschließend in eine Chromatographiehülse aus Polyethylen gefüllt und der Durchfluss gesammelt. Die Säule wird zweimal mit je 4 ml Waschpuffer 1 und viermal mit je 4 ml Waschpuffer 2 gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution des His-Tag-Proteins erfolgt achtmal mit je 1 ml Elutionspuffer. Mit Hilfe der SDS-PAGE werden die proteinhaltigen Elutionsfraktionen identifiziert und vereinigt.

#### Benötigte Puffer:

Waschpuffer 1	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 50 mM Imidazol pH 7,4 (NaOH)
Waschpuffer 2	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 100 mM Imidazol pH 7,4 (HCl)
Elutionspuffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 500 mM Imidazol pH 7,4 (HCl)

### 5.7.4 Lyophilisieren

Die vereinigten Proteinfractionen nach der Nickel-Affinitätschromatographie werden insgesamt fünfmal mit wenigen Millilitern Dialysepuffer, welcher 1 mM PMSF enthält, mit Mikrokonzentratoren gewaschen und aufkonzentriert. Anschließend erfolgt mittels PD-10 Säule laut Herstellervorschrift ein Pufferaustausch gegen den flüchtigeren Triethylammonium-Hydrogencarbonatpuffer. Durch die Lyophilisierung entsteht ein weißer Feststoff, der zur weiteren Verwendung in 100 mM NaOH aufgenommen und bei – 80 °C gelagert wird. Das hierdurch gewonnene all-Ala-BPTI befindet sich bereits in einem bindungskompetenten Zustand und kann direkt für weitere Versuche verwendet werden.

**Benötigte Puffer:**

Dialysepuffer	200 mM Natriumchlorid 20 mM Tris 1 mM PMSF pH 7,4 (HCl), einstellen bei 4 °C
Triethylammonium-Hydrogencarbonatpuffer	10 mM Triethylammonium-Hydrogencarbonat pH 7,4

## 5.8 Chemische Modifizierungen

### 5.8.1 Carboxyamidomethylierung von BPTI

Um einen translokationskompetenten Zustand von kommerziellem BPTI zu erreichen und die Rückfaltung des Proteins zu verhindern, müssen die Disulfidbrücken gespalten und blockiert werden. Zunächst wird eine Lösung von BPTI in Puffer 1 der Konzentration 2 mg/ml angesetzt und das Gemisch über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wird am nächsten Tag eine Endkonzentration von 10 mM DTT zugesetzt und 90 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Um anschließend die Cysteine zu modifizieren, werden 25 mM Iodacetamid zugegeben und 2 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Reaktion sollte frisches Iodacetamid verwendet werden, was an seiner weißen Farbe erkennbar ist. Das Gemisch wird im Folgenden auf eine mit Puffer 2 äquilibrierte PD-10 Säule aufgetragen und nach Herstellervorschrift eluiert, um nicht umgesetzte Reagenzien abzutrennen. Alle proteinhaltigen Fraktionen werden vereinigt und die Endkonzentration des carboxyamidomethylierten BPTIs mittels BCA-Test ermittelt.

**Benötigte Puffer:**

Puffer 1	50 mM Tris 6 M GdnHCl pH 9
Puffer 2	200 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,4 (HCl)





## 5.10 *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI)

Mit Hilfe der MALDI-ToF Analyse wird im Hochvakuum die Molekülmasse ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wird mit Hilfe dieser Technik der Erfolg chemischer Modifizierungen, beispielsweise das Spinlabeling von Proteinen, überprüft. Hierzu werden die Proben unverdaut im Gerät vermessen. Weiterhin werden Proben tryptisch verdaut, so dass definierte Peptidfragmente entstehen, deren Masse ermittelt und anschließend mit einer Computerdatenbank abgeglichen wird. Durch die Übereinstimmung von mehreren Peptidmassen lässt sich somit ein Protein identifizieren. Die Rohdaten werden mit *MassLynx 4.0* gesammelt und anschließend mit *ProteinLynx 2.1* verarbeitet. Als Proteindatenbank dient die *SwissProt Database*.

### 5.10.1 Vorbereitung der unverdauten Proben

Die Probenaufbereitung erfolgt nach Anleitung des *Zip-Tip® User Guide For Reversed Phase* der Fa. Millipore mit *Zip-Tip®* Spitzen. Die Proben werden nach der *Dried Droplet*-Methode auf das Target aufgetragen. Als Matrixlösung dient gesättigte Sinapinsäure (SA-Matrix). Die Kalibrierung des Geräts erfolgt mit dem *Protein Calibration Standard I*, der die Massendetektion in einem Bereich von 4 bis 20 kDa gestattet. Die Aufnahme der jeweiligen Spektren erfolgt nach dem LinTof-Verfahren im positiven Messbereich bei einer Beschleunigungsspannung von 25 kV mit Hilfe einer internen Programmroutine.

### 5.10.2 Vorbereitung der Proben durch tryptischen Verdau

Die Proteine werden mittels SDS-PAGE aufgereinigt und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Durch einen Waschschrift werden Detergenzien und andere Kontaminationen, welche die massenspektroskopische Analyse beeinflussen könnten, entfernt. Anschließend erfolgt die Reduzierung und Alkylierung der Disulfidbrücken, bevor der eigentliche enzymatische Verdau mittels Trypsin durchgeführt wird.

#### Benötigte Puffer und Lösungen:

Lösung A	50 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Lösung B	25 mM Ammoniumhydrogencarbonat 50 % Acetonitril

Reduktionspuffer	50 mM Ammoniumhydrogencarbonat 10 mM DTT
Alkylierungspuffer	50 mM Ammoniumhydrogencarbonat 5 mM Iodacetamid
Trypsin	0,6 % (w/v) Trypsin in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat Lagerung bei – 20 °C

Die entsprechende Gelbande wird 10 min mit 50 µl Lösung A inkubiert, anschließend wird die Lösung entfernt. Es folgt eine 10-minütige Inkubation mit 50 µl Lösung B, diese wird ebenfalls entfernt. Die beiden Schritte werden wiederholt. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit 50 µl Reduktionspuffer bei 56 °C wird auch dieser entfernt. Es folgt eine 30-minütige Inkubation mit 50 µl Alkylierungspuffer bei Raumtemperatur im Dunkeln. Der Puffer wird wieder entfernt und die Inkubation mit Reduktions- und Alkylierungspuffer wiederholt. Nach der Entfernung des Puffers wird das Gelstück in der SpeedVac getrocknet, bevor die Inkubation mit 3 µl Trypsinlösung über Nacht bei 37 °C erfolgt.

**Benötigte Lösung:**

Matrixlösung	50 % Acetonitril 0,1 % TFA 1 % (w/v) HCCA
--------------	---

Am nächsten Tag erfolgt eine 45-minütige Inkubation mit 0,1 % TFA bei Raumtemperatur. Die ZipTip<sup>®</sup>-Spitze mit der C18-Matrix wird mit 10 µl 50 % Acetonitril + 0,1 % TFA zweimal angefeuchtet und anschließend mit 10 µl 0,1 % TFA äquilibriert. 10 µl der verdauten Peptidlösung werden siebenmal mit der ZipTip<sup>®</sup>-Spitze in die C18-Matrix aufgenommen. Die Matrix wird zweimal mit 10 µl 0,1 % TFA gespült. Anschließend werden 2 µl der Matrixlösung aufgenommen und direkt auf das MALDI-Target geben.

## 5.11 *Electron Paramagnetic Resonance-Spektroskopie (EPR)*

### 5.11.1 *Site-Directed Spinlabeling (SDSL) mit MTS und IOPI*

Das Spinlabeling erfolgt nach modifizierter Vorschrift laut Literatur (Crane *et al.*, 2005). Die jeweilige SecB-Mutante (500 bis 800 mM Monomer-Konzentration) wird in 10 mM DTT für 2 – 3 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Das überschüssige Reduktionsmittel wird mittels PD-10 Säule, die mit Puffer SL 1 äquilibriert ist, entfernt. Die SecB-haltigen Fraktionen werden vereinigt. Anschließend wird ein 25- bis 30-facher molarer Überschuss an Spinlabel in Verhältnis zur SecB-Monomer-Konzentration zugegeben. Die Inkubation erfolgt bei 4 °C über Nacht unter leichtem Schütteln. Ungebundenes Spinlabel wird über eine mit Puffer SL 2 äquilibrierte PD-10 Säule abgetrennt. Die proteinhaltigen Fraktionen werden vereinigt und aufkonzentriert. Die Lagerung der gelabelten Proteine erfolgt bei – 80 °C.

Das Spinlabeling der SecB-Mutante C113 erfolgt in Gegenwart von Guanidinhydrochlorid, um das Protein leicht zu entfalten, da sich die jeweiligen Aminosäuren im Inneren des Proteins befinden. Die Versuchsdurchführung erfolgt mit den Puffern SL 1a/2a bzw. SL 1b/2b analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise mit den Puffern SL 1 und SL 2. PreMBP wird in Gegenwart von 2 M GdnHCl zwei Stunden unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur entfaltet. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10 mM DTT, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation. Über eine mit Puffer 2 äquilibrierte PD-10 Säule wird das DTT entfernt. Dem Puffer 2 wird zusätzlich 2 M GdnHCl zugesetzt, um das Protein im entfaltenen Zustand zu halten. Alle proteinhaltigen Fraktionen werden vereinigt und die Proteinkonzentration mittels BCA-Test bestimmt. Anschließend wird ein ca. 20-facher Überschuss an Spinlabel zugegeben und 2,5 Stunden auf Eis inkubiert. Ungebundenes Spinlabel wird über eine mit Puffer 2 (mit zusätzlich 2 M GdnHCl) äquilibrierte PD-10 Säule entfernt. Die proteinhaltigen Fraktionen werden vereinigt und aufkonzentriert. Die Lagerung erfolgt bei – 80 °C.

#### **Benötigte Puffer und Lösungen:**

Puffer SL 1	10 mM HEPES
	300 mM Kaliumacetat
	pH 6,7

---

Puffer SL 2	10 mM HEPES 300 mM Kaliumacetat 5 mM Magnesiumacetat pH 6,7
Puffer SL 1a	10 mM HEPES 300 mM Kaliumacetat 1 M Guanidinhydrochlorid pH 6,7
Puffer SL 2a	10 mM HEPES 300 mM Kaliumacetat 5 mM Magnesiumacetat 1 M Guanidinhydrochlorid pH 6,7
Puffer SL 1b	10 mM HEPES 300 mM Kaliumacetat 3 M Guanidinhydrochlorid pH 6,7
Puffer SL 2b	10 mM HEPES 300 mM Kaliumacetat 5 mM Magnesiumacetat 3 M Guanidinhydrochlorid pH 6,7
MTS-Stammlösung (100 mM)	26,4 mg MTS in 1 ml Acetonitril Lagerung bei – 80 °C im Dunkeln
IOPI-Stammlösung (100 mM)	33,7 mg IOPI in 1 ml DMF Lagerung bei – 80 °C im Dunkeln

### 5.11.2 *Continuous Wave (cw)*-EPR Messungen (X-Band)

Die EPR-Messungen im X-Band-Bereich werden mit einer Scanbreite von 200 G und aus einem Mittelwert von 20 Scans erhalten. Die am Gerät eingestellten Parameter sind in Tabelle 5.38 dargestellt. Bei den Tieftemperaturmessungen wird die Cavity mittels Kryostaten auf ca. 180 K gekühlt. Hierbei wird die Oxford Heliumtransferline oder die Quarz-Transferline der Fa. Bruker verwendet.

**Tab. 5.38:** Eingestellte Parameter der durchgeführten cw-EPR-Messungen im X-Band.

<b>Parameter</b>	<b>Raumtemperatur</b>	<b>Tieftemperatur (ca. 180 K)</b>
Centerfield [G]	3336	3336
Width [G]	200	200
Points	1024	1024
Field Mod. Amplitude	0,0005	0,0005
Field Mod. Frequency [kHz]	100	100
Microwave Power [mW]	4	0,25
Microwave Frequency [GHz]	9,37	9,37
Receiver Gain [dB]	50	50
Receiver Time Constant [ms]	1,28	1,28
Number of Scans	20	20
Sampling Time [s]	0,02	0,02

### 5.11.3 *Double Electron-Electron Resonance (DEER)*-Messungen

Die DEER-Messungen werden in Mainz am Max Planck Institut für Polymerforschung im Arbeitskreis von Prof. Spiess aufgezeichnet. Das Probenvolumen liegt bei 80  $\mu\text{l}$ . Die Proben werden in Quarzkapillaren mit einem Außendurchmesser von 3 mm aufgenommen und in *iso*-Pentan, welches in einem Bad aus flüssigem Stickstoff gekühlt ist, schockgefroren. Die Aufzeichnung der dipolaren Evolutionszeit erfolgt bei X-Band-Frequenzen von 9,2 bis 9,4 GHz unter Anwendung einer internen Messroutine.

## Literatur

- Anfinsen C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 23–30.
- Antonoaea R., Fürst M., Nishiyama K. (2008) The periplasmatic chaperone PpiD interacts with secretory proteins exiting from the SecYEG translocon. *Biochemistry*, **47**, 5649–5656.
- Ascenzi P., Bocedi A., Bolognesi M., Spallarossa A., Coletta M., Christofaro R.D., Menegatti E. (2003) The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr. Protein Peptide Sci.*, **4**, 231–251.
- Bensadoun A., Weinstein D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry*, **70**.
- Berliner L.J., Eaton R.G., Eaton S.S. (2000) *Biological magnetic resonance: Distance Measurements in Biological Systems by EPR*. Kluwer Academic, New York.
- Berliner L.J., Grunwald J., Hankovszky H.O., Hideg K. (1982) A Novel Reversible Thiol Specific Spin Label: Papain Active Site Labeling and Inhibition. *Analytical Biochemistry*, **119**, 450–455.
- Blobel G., Dobberstein B. (1975) Transfer of proteins across membranes. *J. Cell. Biol.*, **67**, 835–851.
- Boos W., Shuman H. (1998) Maltose/Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Transport, Metabolism and Regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 204–229.
- Buchner J. (2002) Introduction: the cellular protein folding machinery. *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1587–1588.
- Chen L., Tai P.C. (1987) Evidence for the involvement of ATP co-translational protein translocation. *Nature*, **328**, 164–166.
- Corsi A.K., Schekman R. (1996) Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **271**, 30.299–30.302.
- Crane J.M., Mao C., Lilly A.A., Smith V.F., Suo Y., Hubbell W.L., Randall L.L. (2005) Mapping of the docking of SecA onto the chaperone SecB by site-directed spin la-

- beling: Insight into the mechanism of ligand transfer during protein export. *J. Mol. Biol.*, **353**, 295–307.
- Crane J.M., Suo Y., Lilly A.A., Mao C., Hubbell W.L., Randall L.L. (2006) Sites of Interaction of a Precursor Polypeptide on the Export Chaperone SecB Mapped by Site-directed Spin Labeling. *J. Mol. Biol.*, **363**, 63–74.
- de Vrije T., Batenburg A.M., Killian J.A., de Kruijff B. (1990) Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **4**, 143–150.
- Dekker C., de Kruijff B., Gros P. (2003) Crystal structure of SecB from *Escherichia coli*. *Journal of Structural Biology*, **144**, 313–319.
- den Blaauwen T., Driessen A.J.M. (1996) Sec-dependent preprotein translocation in bacteria. *Arch Microbiol*, **165**, 1–8.
- Diamond D.L., Randall L.L. (1997) Kinetic Partitioning. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 28.994–28.998.
- Diamond D.L., Strobel S., Chun S.Y., Randall L.L. (1995) Interaction of SecB with intermediates along the folding pathway of maltose-binding protein. *Protein Sci.*, **4**, 1118–1123.
- Dittrich M., Kanchanawarin C. (2011) Case study: BPTI. <http://www.ks.uiuc.edu/Training/CaseStudies/pdfs/bpti.pdf>, 1–19.
- Driessen A.J.M. (2001) SecB, a molecular chaperone with two faces. *TRENDS in Microbiology*, **9**, 193–196.
- Driessen A.J.M., Fekkes P., van der Wolk J.P.W. (1998) The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**, 216–222.
- Driessen A.J.M., Nouwen N. (2008) Protein Translocation Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Annual Review of Biochemistry*, **77**, 643–667.
- Duplay P., Bedouelle H., Fowler A., Zabin I., Saurin W., Hofnung M. (1984) Sequences of the malE gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.*, **259**, 10.606–10.613.
- Fekkes P., de Wit J.G., van der Wolk J.P., Kimsey H.H., Kumamoto C.A., Driessen A.J.

- (1998) Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the cooperative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Mol. Microbiol.*, **29**, 1179–1190.
- Fekkes P., den Blaauwen T., Driessen A.J.M. (1995) Diffusion-limited interaction between unfolded polypeptides and the *Escherichia coli* chaperone SecB. *Biochemistry*, **34**, 10.078–10.085.
- Fekkes P., Driessen A.J.M. (1999) Protein Targeting to the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**, 161–173.
- Fekkes P., van der Does C., Driessen A.J. (1997) The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.*, **16**, 6105–6113.
- Fröbel J., Rose P., Müller M. (2012) Twin-arginine-dependent translocation of folded proteins. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **367**, 1029–1046.
- Fürst M., Müller M. (2010) Proteintranslokation über bakterielle Membranen. *Biospektrum*, **5**, 508–512.
- Griffith O.H., Waggoner A.S. (1969) Nitroxide Free Radicals: Spin Labels for Probing Biomolecular Structure. *Accounts of Chemical Research*, **2**, 17–24.
- Haimann M.M. (2012) *Proteintransport in E. coli: Untersuchung der Konformationsänderungen des Chaperons SecB durch Bindung an das Modellsubstrat Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (BPTI) mit Hilfe der ESR-Spektroskopie*. Doktorarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Haimann M.M., Akdogan Y., Philipp R., Varadarajan R., Hinderberger D., Trommer W.E. (2011) Conformational changes of the chaperone SecB upon binding to a model substrate – bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). *Biol. Chem.*, **392**, 849–858.
- Hardy S.J., Randall L.L. (1989) Biochemical investigation of protein export in *Escherichia coli*. *J. Coll. Sci. Suppl.*, **11**, 29–43.
- Hardy S.J.S., Randall L.L. (1991) A Kinetic Partitioning Model of Selective Binding of Nonnative Proteins by the Bacterial Chaperone SecB. *Science*, **251**, 439–443.
- Hartl F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571–580.



- Hartnett J., Gracyalny J., Slater M.R. (2006) The Single Step (KRX) Competent Cells: Efficient Cloning and High Protein Yields. *Protein Expression (Promega Corporation)*, **94**, 27–30.
- Hubbell W.L., Altenbach C. (1994) Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 566–573.
- Inoue H., Nojima H., Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23–28.
- Jeschke G. (1998) Einführung in die ESR-Spektroskopie – Skript zur Vorlesung von H. W. Spiß. *Johannes-Guttenberg-Universität Mainz*.
- Kadokura H., Beckwith J. (2009) Detecting folding intermediates of a protein as it passes through the bacterial translocation channel. *Cell*, **138**, 1164–1173.
- Khisty V.J., Munske G.R., Randall L.L. (1995) Mapping of the Binding Frame for the Chaperone SecB within a Natural Ligand, Galactose-binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 25.920–25.927.
- Kim J., Kendall D. (2000) Sec-dependent protein export and the involvement of the molecular chaperone SecB. *Cell Stress Chaperones*, **5**, 267–275.
- Koolman J., Röhm K.H. (2003) *Taschenatlas der Biochemie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Krishnan B. (2004) *Biophysical characterization of interaction of SecB with MBP and preMBP: in vitro studies*. Doktorarbeit, Indian Institute of Science.
- Krishnan B., Kulothungan S.R., Patra A.K., Udgaonkar J.B., Varadarajan R. (2009) SecB-mediated Protein Export Need Not Occur via Kinetic Partitioning. *Journal of Molecular Biology*, **385**, 1243–1256.
- Kunitz M., Northrop J.H. (1936) Isolation From Beef Pancreas of Crystalline Trypsinogen, Trypsin, a Trypsin Inhibitor, and an Inhibitor-Trypsin Compound. *J. Gen. Physiol.*, **19**, 991–1007.
- Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Lecker S.H., Driessen A.J., Wickner W. (1990) ProOmpA contains secondary and tertiary

- structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. *EMBO J.*, **9**, 2309–2314.
- Levinthal C. (1968) Are there Pathways for Proteinfolding? *J. Chim. Phys.*, **65**, 44–45.
- Likhtenshtein G.I. (1976) Spin Labeling Methods in Molecular Biology. *Wiley-VCH New York*.
- Litterer L., Schagat T. (2007) Protein Expression in Less Time: A Short Induction Protocol for KRX. *Protein Expression (Promega Corporation)*, **96**, 20–21.
- Liu G., Topping T.B., Cover W.H., Randall L.L. (1988) Retardation of Folding as a Possible Means of Suppression of a Mutation in the Leader Sequence of an Exported Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 14.790–14.793.
- Lottspeich F., Engels J.W. (2012) *Bioanalytik*. Springer Spektrum.
- Luirink J., Dobberstein B. (1994) Mammalian and *Escherichia coli* signal recognition particles. *Mol. Microbiol.*, **11**, 9–13.
- Lycklama a Nijeholt J.A., Driessen J.M. (2012) The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **367**, 1016–1028.
- Mahdy A.M., Webster N.R. (2004) Perioperative systemic haemostatic agents. *Br. J. Anaesth.*, **93**, 842–858.
- Mannucci P.M. (1998) Hemostatic drugs. *N. Engl. J. Med.*, **339**, 245–253.
- Matlack K.E.S., Mothes W., Rapoport T.A. (1998) Protein Translocation: Tunnel Vision. *Cell*, **92**, 381–390.
- Mogk A., Mayer M., Deuerling E. (2001) Mechanismen der Proteinfaltung: Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. *Biologie in unserer Zeit*, **3**, 182–192.
- Mori H., Ito K. (2001) The Sec protein-translocation pathway. *Trends in Microbiology*, **9**, 494–500.
- Pannier M., Veit S., Godt A., Jeschke G., Spiess H.W. (2000) Dead-Time Free Measurement of Dipole-Dipole Interactions between Electron Spins. *Journal of Magnetic Resonance*, **142**, 331–340.

- Panse V., Beena K., Philipp R., Trommer W.E., Vogel P.D., Varadarajan R. (2001) Electron spin resonance and fluorescence studies of the bound-state conformation of a model protein substrate to the chaperone SecB. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 33.681–33.688.
- Panse V.G., Udgaonkar J.B., Varadarajan R. (1998) SecB binds only to a late native-like intermediate in the folding pathway of barstar and not to the unfolded state. *Biochemistry*, **37**, 14.477–14.483.
- Parkin S., Rupp B., Hope H. (1996) Structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor at 125 K definition of carboxyl-terminal residues Gly57 and Ala58. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **52**, 18–29.
- Qiagen (2003) A handbook for high-level expression and purification of 6x His-tagged proteins. *The QIAexpressionist*, **6**, 18–19.
- Quiococho F.A., Spurlino J.C., Rodseth L.E. (1997) Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor. *Structure*, **5**, 997–1015.
- Randall L.L., Hardy S.J.S. (2002) SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **59**, 1617–1623.
- Randall L.L., Topping T.B., Hardy S.J.S. (1990) No Specific Recognition of Leader Peptide by SecB, a Chaperone Involved in Protein Export. *Science*, **248**, 860–863.
- Randall L.L., Topping T.B., Hardy S.J.S., Pavlov M.Y., Freistroffer D.V., Ehrenberg M. (1997) Binding of SecB to ribosom-bound polypeptide has the same characteristics as binding full-length, denatured proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 802–807.
- Randall L.L., Topping T.B., Suci D., Hardy S.J.S. (1998) Calorimetric analyses of the interaction between SecB and its ligands. *Protein Sci.*, **7**, 1195–1200.
- Rapoport T.A., Jungnickel B., Kutay U. (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 271–303.
- Sala A., Bordes P., Genevaux P. (2014) Multitasking SecB chaperones in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, **5**, doi:10.3389/fmicb.2014.00.666.

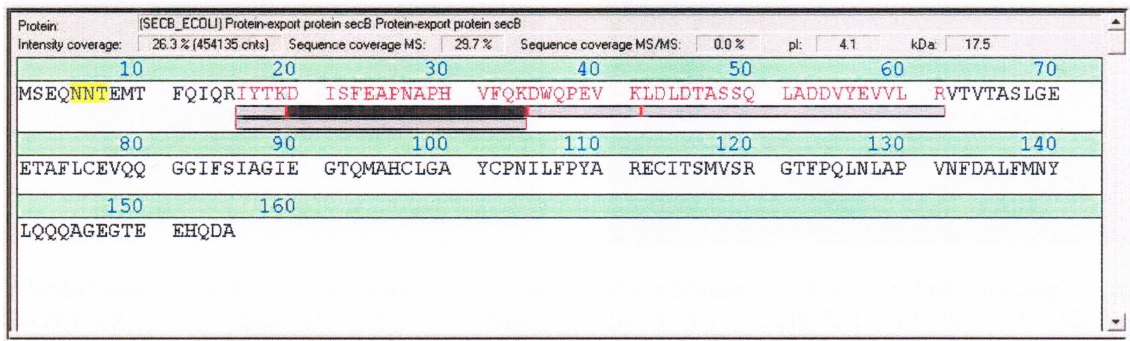
- Schagat T., Friedman R., Ohana, Otto P., Hartnett J., Slater M. (2008) KRX Autoinduction Protocol: A Convenient Method for Protein Expression. *Protein Expression (Promega Corporation)*, **98**, 16–18.
- Schatz P.J., Riggs P.D., Jacq A., Fath M.J., Beckwith J. (1989) The secE gene encodes an integral membrane protein required for protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, **3**, 1035–1044.
- Schiebel E., Driessen A.J.M., Hartl F.U., Wickner W. (1991)  $\Delta\mu_{H^+}$  and ATP function at different steps in the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell*, **64**, 927–939.
- Schultz C.P. (2000) Illuminating folding intermediates. *Nature Struct. Biol.*, **7**, 7–10.
- Schweiger A. (2003) *Elektronen Spin Resonanz*. Vorlesungsskript ETH Zürich.
- Shilton B.H., Flocco M.M., Nilsson M., Mowbray S.L. (1996) Conformational Changes of Three Periplasmic Receptors for Bacterial Chemotaxis and Transport: The Maltose-, Glucose/Galactose- and Ribose-binding Proteins. *J. Mol. Biol.*, **264**, 350–363.
- Sijbrandi I., Urbanus M.L., Hagen-Jongman C.M.T., Bernstein H.D., Oudega B., Otto B.R., Luirink J. (2003) Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 4654–4659.
- Smith (1995) Proteins. *Methods in Molecular Biology*, **1**, 41–56.
- Spurlino J.C., Lu G.Y., Quioco F.A. (1991) The 2.3-Å Resolution Structure of the Maltose- or Maltodextrin-binding Protein, A Primary Receptor of Bacterial Active Transport and Chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, **266**, 5202–5219.
- Steinhoff H.J. (2004) Inter- and intra-molecular distances determined by EPR spectroscopy and site-directed spin labeling reveal protein-protein and protein-oligonucleotide interaction. *Biol. Chem.*, **385**, 913–920.
- Steinhoff H.J., Dombrowsky O., Karim C., Schneiderhan C. (1991) Two dimensional diffusion of small molecules on protein surfaces: an EPR study of the restricted translational diffusion of protein-bound spin labels. *Eur. Biophys. J.*, **20**, 293–303.
- Steinhoff H.J., Savitsky A., Wegener C., Pfeiffer M., Plato M., Möbius K. (2000) High-

- field EPR studies of the structure and conformational changes of site directed spin labeled bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1457**, 253–262.
- Stryer L. (1996) *Biochemie*. Spektrum Akad. Verl.; Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Topping T.B., Randall L.L. (1994) Determination of the binding frame within a physiological ligand for the chaperone SecB. *Protein Science*, **3**, 730–736.
- Trommer W.E. (2012) Biochemisches Praktikum für Biophysiker – Technische Universität Kaiserslautern. *Praktikumsskript*.
- van den Berg B., Clemons W.M., Collinson I., Modis Y., Hartmann E., Harrison S.C., Rapoport T.A. (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, **427**, 36–44.
- Walden M. (2002) *Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung von zirkulierenden Proteinase-inhibitorischen Peptiden*. Doktorarbeit, Universität Hannover.
- Wert J.E., Bolton J.E. (1972) *Electron Spin Resonance – Elementary Theory and Practical Applications*. Chapman and Hall, New York.
- Wickner W., Leonard M.R. (1996) *Escherichia coli* Preprotein Translocase. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 29.514–29.516.
- Wickner W., Schekman R. (2005) Protein Translocation Across Biological Membranes. *Science*, **310**, 1452–1456.
- Xu Z., Knafels J.D., Yoshino K. (2000) Crystal structure of the bacterial protein export chaperone SecB. *Nature Struct. Biol.*, **7**, 1172–1177.
- Yan S., Wu G. (2015) Large-Scale Evolutionary Analyses on SecB Subunits of Bacterial Sec System. *PLoS ONE*, **10**, DOI:10.1371/journal.pone.0120.417.
- Zhou J., Xu Z. (2003) Structural determinants of SecB recognition by SecA in bacterial protein translocation. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 942–947.
- Zhou J., Xu Z. (2005) The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function. *Molecular Microbiology*, **58**, 349–357.
- Zhou Y., Bowler B.E., Lynch K., Eaton S.S., Eaton G.R. (2000) Interspin distances in

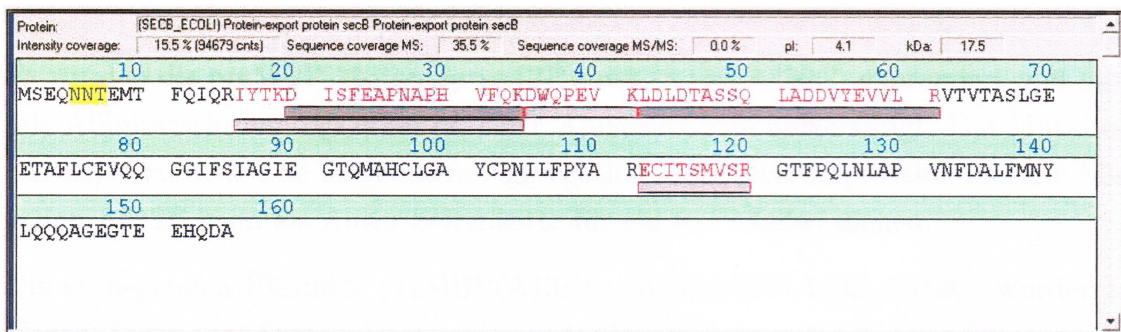
spin-labeled metmyoglobin variants determined by saturation recovery EPR. *Biophysical Journal*, **79**, 1039–1052.

## A Anhang

### A.1 MALDI-ToF Massenspektren des tryptischen Verdau von SecB



**Abb. A.1:** Tryptischer Verdau von SecB WT. Die grauen Balken unter der Aminosäuresequenz zeigen im Verdau wiedergefundene Bereiche. Die Sequenzabdeckung liegt bei 30 %.



**Abb. A.2:** Tryptischer Verdau von SecB E90C. Die grauen Balken unter der Aminosäuresequenz zeigen im Verdau wiedergefundene Bereiche. Die Sequenzabdeckung liegt bei 36 %.

## A.2 Plasmidkarten

### Vektor pET20b(+)

**pET-20b(+) sequence landmarks**

T7 promoter	353-369
T7 transcription start	352
<i>pelB</i> coding sequence	224-289
Multiple cloning sites ( <i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-225
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
pBR322 origin	1500
<i>bla</i> coding sequence	2261-3118
f1 origin	3250-3705

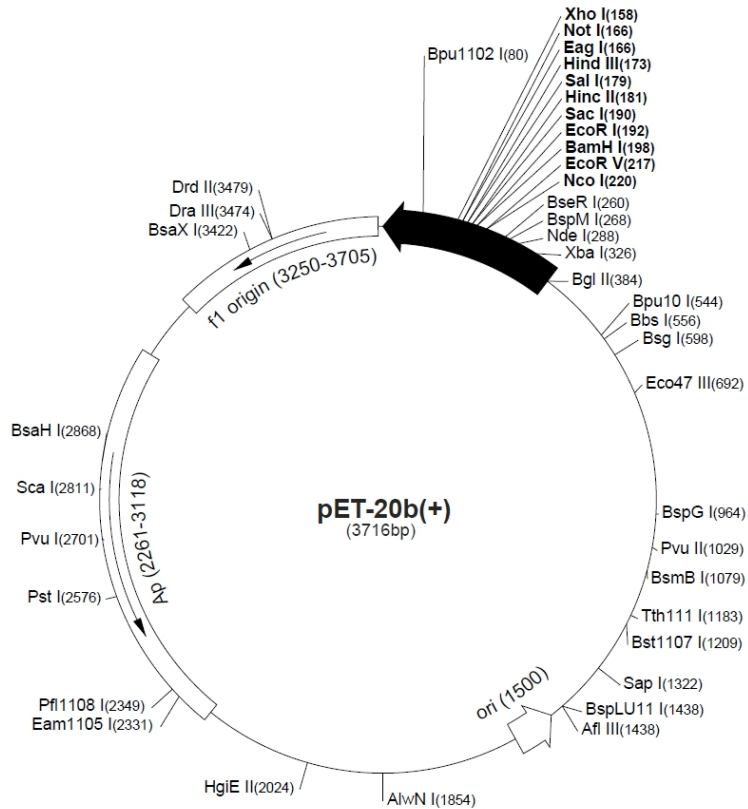
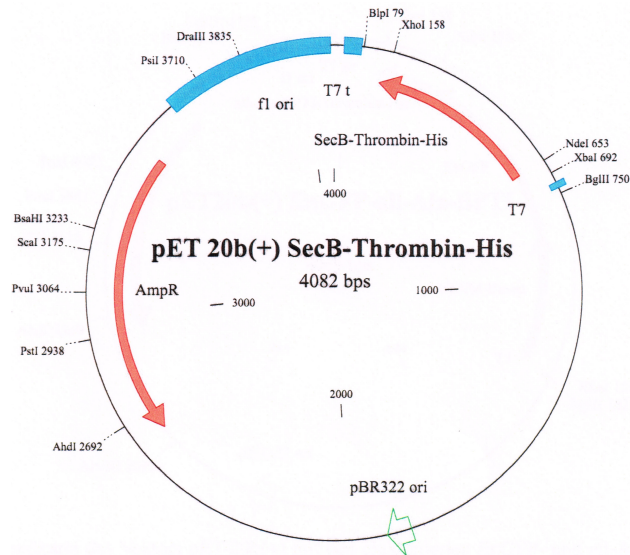


Abb. A.3: Plasmidkarte des Vektors pET20b(+)  
der Fa. Novagen (Quelle: Novagen).

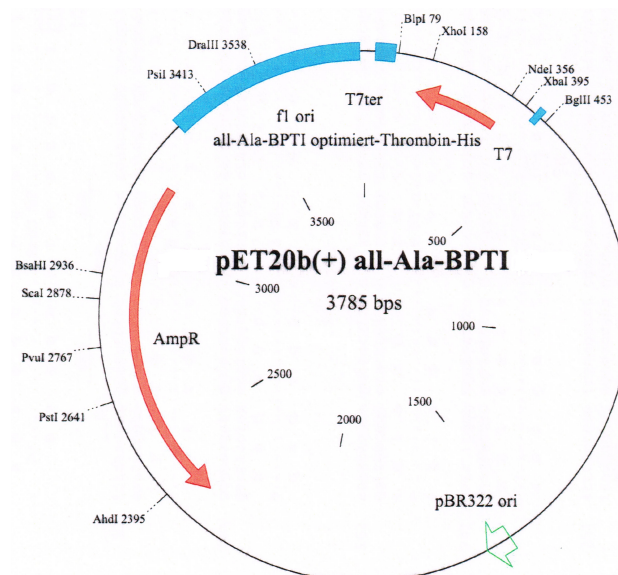


### Vektor pET20b(+)**SecB**



**Abb. A.4:** Plasmidkarte des Vektors pET20b(+) mit dem einklonierten SecB-Gen, der Thrombinschnittstelle sowie dem 6x His-Tag.

### Vektor pET20b(+)**all-Ala-BPTI**



**Abb. A.5:** Plasmidkarte des Vektors pET20b(+) mit dem einklonierten all-Ala-BPTI-Gen, der Thrombinschnittstelle sowie dem 6x His-Tag.

## A.3 Sequenzierergebnisse

### Sequenzierung SecB WT



Abb. A.6: Sequenzanalyse für SecB WT. Alle relevanten Aminosäuren sind durch blaue Markierungen hervorgehoben. Das SecB WT-Protein besitzt an den Aminosäurepositionen 76, 97, 102 und 113 Cysteine.



## Sequenzierung SecB Q14C

```

1 acatatgtca gaacaaaca acactgaaat gaettcccag atctcccgcta HincII HpaI
  tgtatcagat ctgttttgt tgtgacttta ctgaaaggtc tagacggcat
  h m s e q n t e m t f q i c r
  >>.....SecB.....>
  m s e q n n t e m t f q i c r
  14

51 ttataccaa ggatctctt ttccgaagcgc cgaacgcgcc gcacgttttc
  aaatatggtt cctatagaga aagettccgc gcttgccggc cgtgcaaaaag
  i y t k d i s f e a p n a p h v f
  >.....SecB.....>
  i y t k d i s f e a p n a p h v f

101 cagaagatt ggaaccaga agttaaacct gatctggata cggcatcttc
  gctttctaa cegttgtct tcaattgaa ctagacctat gcctgagaag
  >.....SecB.....>
  q k d w q p e v k l d l d t a s
  >.....SecB.....>
  q k d w q p e v k l d l d t a s

151 ccaactggca gatgcgtat acgaagtgtt actgctgttt accgtaacgg
  ggttgaccgt ctaactgata tgcctacca tgcgcacaa tggcattgcc
  s q l a d d v y e v v l r v t v t
  >.....SecB.....>
  s q l a d d v y e v v l r v t v t

201 cctctttgg cgaagaacc gcgttctctt gtgaagtca gcaggcgggt
  ggagaacc gcttcttgg cgaaggaaca caettcaagt cgtcccgcga
  a s l g e e t a f l c e v q q g g
  >.....SecB.....>
  a s l g e e t a f l c e v q q g g

251 attttccca tcgctggat cgaagccacc cagatggcg attgctctgg
  taaaagagt agcggccata gcttccgtgg gctaccgg taacggacc
  >.....SecB.....>
  i f s i a g i e g t q m a h c l
  >.....SecB.....>
  i f s i a g i e g t q m a h c l

301 agcatactgc cgaacattc tgttccccta tgcctgtgag tgcatacaca
  tcgtatgacg ggcttgaag acaagggcat acgagcactc acgtagtgtt
  >.....SecB.....>
  g a y c p n i l f p y a r e c i t
  >.....SecB.....>
  g a y c p n i l f p y a r e c i t

219 gcatggtatc ccgggttaca ttcccacaac tgaaccttgc gccggttaac
  cgtaccatag ggcgccatgt aaggcggtg acttggaaac cggccaattg
  s m v s r g t f p q l n l a p v n
  >.....SecB.....>
  s m v s r g t f p q l n l a p v n

401 ttccgatggc tgttcataaa ctatttgcag cagcaggctg gcgaaggctac
  aagctaccgg acaagtactt gataaacgtc gtcgtcccac cgcttccatg
  f d a l f m n y l q q q a g e g
  >.....SecB.....>
  f d a l f m n y l q q q a g e g

451 tgaagaacat caggatgcca gcagcgccct ggtgccgcgc ggcagcctcg
  acttttggta gtcctacggg cgtcgcggga ccaeggcgcg ccgtcggagc
  >.....SecB.....>
  t e e h q d a s s g l v p r g s l
  >.....SecB.....>
  t e e h q d a
  Thrombinschnittstelle >>.....l v p r g s

501 agcaccacca ccaccaccac tgagat
  tegtgtggt ggtgtgtgtg actcta
  e h h h h h h - d
  >>..6x His-Tag...>>
  h h h h h h h

```

Abb. A.8: Sequenzanalyse der SecB-Mutante Q14C. Das Glutamin an Aminosäureposition 14 wird durch ein Cystein ersetzt, alle anderen Aminosäuren sind identisch mit dem Wildtyp-Protein.

Sequenzierung SecB C109

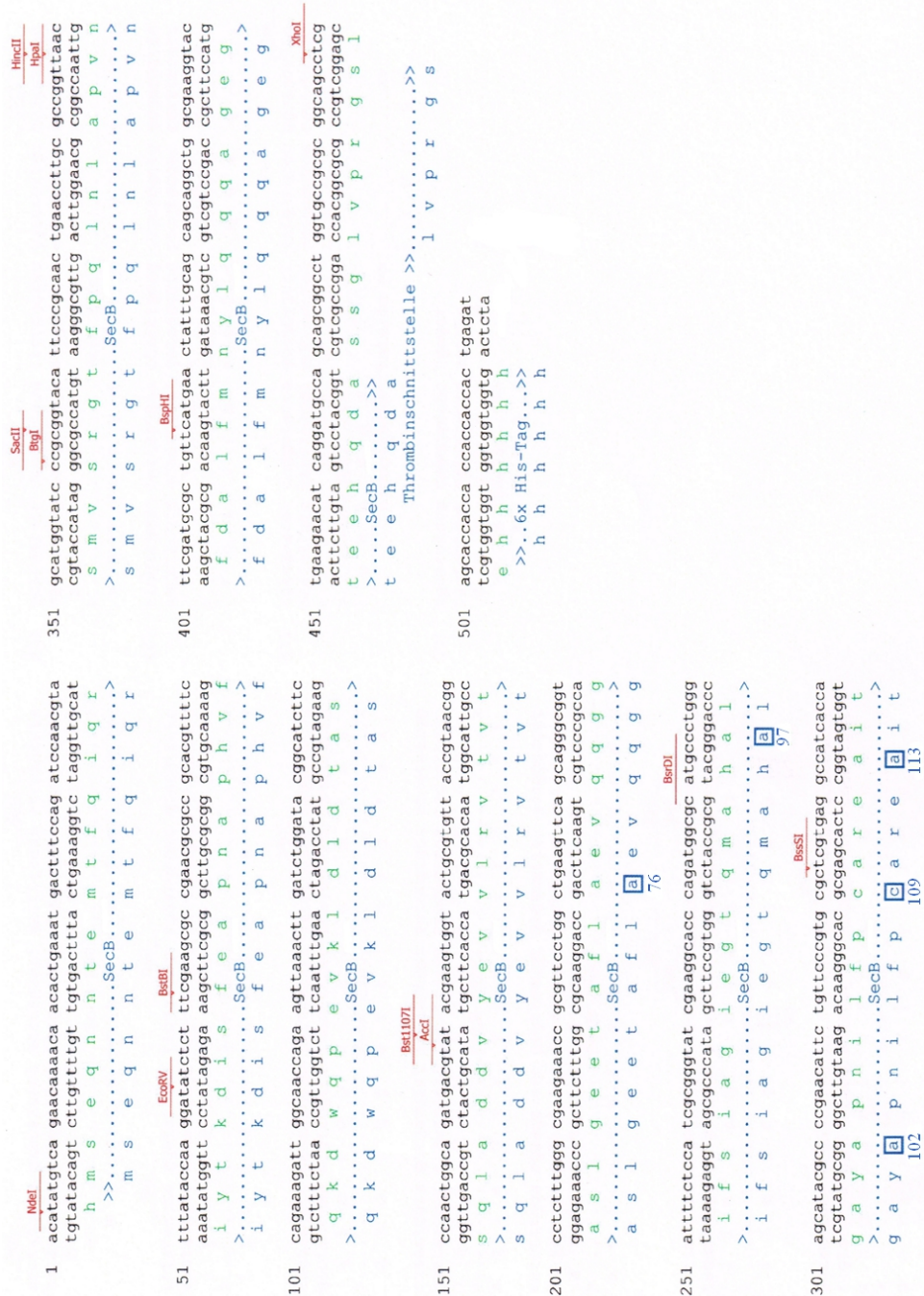


Abb. A.9: Sequenzanalyse der SecB-Mutante C109. Die blau markierten Aminosäuren an den Positionen 76, 97, 102 und 113 sind im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz in Alanin getauscht. An Position 109 ist ein einzelnes Cystein eingefügt.

## Sequenzierung SecB C113

```

1  acatagfca gaacaaaaca acaactgaat gactttccag atccaacgta
   h m s e q n n t e m t f q i q r
   >>.....SecB.....>
   m s e q n n t e m t f q i q r

51  ttataccaa ggatatcct ttcgaagcgc cgaacgcgc gcacgttttc
   aaataggtt cctatagaga aagttcgcg gcttgccgg cgtgcaaaa
   i y t k d i s f e a p n a p h v f
   >.....SecB.....>
   i y t k d i s f e a p n a p h v f

101 cagaagatt ggcaaccaga agttaaact gatctggata cggcatcttc
   gtttctaa cngtggctt tcaattgaa ctgacctat cgcgtagaag
   q k d w q p e v k l d l d t a s
   >.....SecB.....>
   q k d w q p e v k l d l d t a s

151 ccaactggca gatgacgat acgaagtgtt acitgctgtt accgtaacgg
   s q l a d d v y e v v l r v t v t
   >.....SecB.....>
   s q l a d d v y e v v l r v t v t

201 cctctttggg cgaagaacc cggttcctgg ctgaagtcca gcaggcgggt
   ggagaacc cgtctttgg cgaaggacc gacttcaagt cgtcccgcga
   a s l g e e t a f l a e v q q g g
   >.....SecB.....>
   a s l g e e t a f l a e v q q g g
   76

251 attttcca tcgcggtat cgaaggcacc cagatggcgc atgcccctggg
   taaaagagt agcggccata gcttccgtgg gtctaccgg tacgggacc
   i f s i a g i e g t q m a h a l
   >.....SecB.....>
   i f s i a g i e g t q m a h a l
   97

301 agcatacacc cgaacaattc tgtccccta tgcctgtag tgcatacca
   tcgtatcgg ggetttagt acaaggcat acgagcact acgtagtgtt
   g a y a p n i l f p y a r e c i t
   >.....SecB.....>
   g a y a p n i l f p y a r e c i t
   102 113

```

HincII HpaI  
 SecII BglI  
 351 gcaatggatc ccgcggtaca ttcccgaac tgaaccttgc gccggttaac  
 cgtaccatag ggcccatgt aaggcgttg acttgaacg cggcaattg  
 s m v s r g t f p q l n l a p v n  
 >.....SecB.....>  
 s m v s r g t f p q l n l a p v n

BspHI  
 401 ttcatgccc tgttcatgaa ctatttccag cagcaggctg gcgaaggtac  
 aagctacggc acaagtactt gataaacgc gtctccgac cgcttccatg  
 f d a l f m n y l q q a g e g  
 >.....SecB.....>  
 f d a l f m n y l q q a g e g

XhoI  
 451 tgaagaacat caggatgcca gcaggcctt ggtgcgcgc ggcagcctcg  
 acttcttga gtctacggt cgtcgcgga ccacgcgcg ccgtcggagc  
 t e h q d a s s g l v p r g s l  
 >.....SecB.....>  
 t e h q d a s s g l v p r g s l  
 Thrombinschnittstelle >>.....>>  
 l v p r g s

501 agcaccacca caaccaccac ttagat  
 tcgtgggtgt ggtgggtgtg actcta  
 e h h h h h h h  
 >>..6x His-Tag...>>  
 h h h h h h h h

EcoRV  
 51 ttataccaa ggatatcct ttcgaagcgc cgaacgcgc gcacgttttc
 aaataggtt cctatagaga aagttcgcg gcttgccgg cgtgcaaaa
 i y t k d i s f e a p n a p h v f
 >.....SecB.....>
 i y t k d i s f e a p n a p h v f

BspBI  
 101 cagaagatt ggcaaccaga agttaaact gatctggata cggcatcttc
 gtttctaa cngtggctt tcaattgaa ctgacctat cgcgtagaag
 q k d w q p e v k l d l d t a s
 >.....SecB.....>
 q k d w q p e v k l d l d t a s

Bsa1107I  
 AccI  
 151 ccaactggca gatgacgat acgaagtgtt acitgctgtt accgtaacgg
 sq l a d d v y e v v l r v t v t
 >.....SecB.....>
 sq l a d d v y e v v l r v t v t

201 cctctttggg cgaagaacc cggttcctgg ctgaagtcca gcaggcgggt
 ggagaacc cgtctttgg cgaaggacc gacttcaagt cgtcccgcga
 a s l g e e t a f l a e v q q g g
 >.....SecB.....>
 a s l g e e t a f l a e v q q g g
 76

BspDI  
 251 attttcca tcgcggtat cgaaggcacc cagatggcgc atgcccctggg
 taaaagagt agcggccata gcttccgtgg gtctaccgg tacgggacc
 i f s i a g i e g t q m a h a l
 >.....SecB.....>
 i f s i a g i e g t q m a h a l
 97

BssSI  
 301 agcatacacc cgaacaattc tgtccccta tgcctgtag tgcatacca
 tcgtatcgg ggetttagt acaaggcat acgagcact acgtagtgtt
 g a y a p n i l f p y a r e c i t
 >.....SecB.....>
 g a y a p n i l f p y a r e c i t
 102 113

**Abb. A.10:** Sequenzanalyse der SecB-Mutante C113. Die blau markierten Aminosäuren an den Positionen 76, 97 und 102 sind im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz in Alanin getauscht. Das in der Wildtyp-Sequenz vorkommende Cysteine an Position 113 ist wieder von Alanin zurück in Cystein mutiert.

## B Danksagungen

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Personen, die mich während meiner Diplom- und Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Trommer an der Technischen Universität in Kaiserslautern unterstützt haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein ausdrücklicher Dank gilt...

- Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer für die Überlassung des Promotionsthemas, seine fortwährende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie der Möglichkeit, diese Dissertation auch nach vielen, vielen Jahren nach meiner Zeit im Arbeitskreis noch fertig zu stellen.
- Prof. Dr. Antonio Pierik für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Prof. Dr. Werner Thiel für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.
- Dr. Reinhard Philipp für sämtliche Literaturbestellungen, die unzähligen Stunden an seinem Computer für das *Molecular Modeling* und die Hilfe bei sämtlichen Computerproblemen.
- Herrn Dr. Aleksei Volkov (MPI für Polymerforschung Universität Mainz, Arbeitskreis Dr. Spiess) für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der DEER-Messungen, die anschließende Datenanalyse sowie die Bereitstellung von Messzeit.
- Prof. Dr. Raghavan Varadarajan vom Indian Institute of Science in Bangalore/Indien für die Übersendung der SecB-Gene.
- Dr. Michaela Haimann für die lustige Zusammenarbeit im Labor sowie ihre Freundschaft.
- Dr. Mirza Jakupovic für seine Hilfe bei den gentechnischen Experimenten sowie seine fröhliche Art.
- in chronologischer Reihenfolge meinen Diplomanden Dr. Fabian Leinisch, Dr. Michaela Haimann, Dr. Ruth Amann und Anna Weyrauch für ihre engagierte und erfolgreiche Mitarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit sowie Dr. Laura Gilberg und Carolin Schneider für ihre Arbeit im Rahmen des Forschungspraktikums.
- Frau Carolin Fluck, Frau Elke Litmianski und Frau Yvonne Lorat für ihre freundliche Hilfe und Unterstützung während der gesamten Zeit im AK Trommer.

- allen ehemaligen und aktuellen Arbeitskreismitgliedern für das sehr gute Arbeitsklima und die gemeinsame Zeit.
- dem Team der Chemikalienausgabe für die Beschaffung aller benötigten Chemikalien.
- allen Menschen in meinem privaten und beruflichen Umfeld, die mich auch nach vielen Jahren immer wieder gefragt haben, was die Promotion macht und somit vielleicht auch ein kleines Bisschen mitgeholfen haben, dass diese Arbeit noch beendet wird.
- allen Personen, die beim Korrekturlesen mitgeholfen haben.
- vor allen meinen lieben Eltern, denen ich an dieser Stelle ganz besonders für die moralische und auch finanzielle Unterstützung während des Studiums und der Promotion danke.



## C Publikationen

### Tagungsbeiträge

- **Conformational Changes and Bound State Conformation of Maltose Binding Protein (MBP) upon Interaction with the Chaperone SecB: EPR and Fluorescence Studies**  
A. Baron, K. Beena, G. Jeschke, F. Leinisch, M.M. Haimann, M.N. Raju, A. Volkov, R. Varadarajan and W.E. Trommer  
*50th Annual Meeting Biophysical Society, Salt Lake City, Utah (USA) 18. – 22.02.2006.*
- **Conformational Changes of SecB upon Interaction with Substrates as Studied by EPR Spectroscopy**  
W.E. Trommer, A. Baron, M.M. Haimann, G. Jeschke, F. Leinisch, M.N. Raju, A. Volkov and R. Varadarajan  
*20th Symposium of The Protein Society, San Diego, California (USA) 05. – 09.08.2006.*
- **Conformational Changes and Bound State Conformation of Maltose Binding Protein (MBP) upon Interaction with the Chaperone SecB: EPR and Fluorescence Studies**  
A. Baron, K. Beena, G. Jeschke, F. Leinisch, M.M. Haimann, M.N. Raju, A. Volkov, R. Varadarajan and W.E. Trommer  
*58. Mosbacher Kolloquium, Protein and Lipid Sorting in Health and Disease, Mosbach (Deutschland) 29. – 31.03.2007.*
- **Conformational Changes of SecB upon Interaction with Maltose Binding Protein (MBP) as well as the Precursor Form, preMBP: EPR and Fluorescence Studies**  
A. Baron, M.M. Haimann, F. Leinisch, R. Varadarajan and W.E. Trommer  
*7th European Symposium of the Protein Society, Stockholm/Uppsala (Schweden) 12. – 16.05.2007.*

## D Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Anja Baron

### BERUFSERFAHRUNG

05/2017 Ernennung zur Oberstudienrätin  
02/2011 Ernennung zur Studienrätin  
02/2009 – 01/2011 Referendariat (Seiteneinstieg) am Staatl. Studienseminar  
für das Lehramt an Gymnasien Speyer

### HOCHSCHULBILDUNG

08/2011 – 08/2012;  
08/2004 – 07/2009 Dissertation an der Technischen Universität Kaiserslautern  
unter Anleitung von Prof. Dr. W. E. Trommer  
Thema: Versuche zur Proteinsekretion bei *Escherichia  
Coli*: SecB  
10/2003 – 06/2004 Diplomarbeit an der Technischen Universität Kaiserslautern  
unter Anleitung von Prof. Dr. W. E. Trommer  
Thema: Biochemische Charakterisierung der Glucose-  
Dye-Oxidoreduktase  
10/1999 – 06/2004 Studium der Biologie an der Technischen Universität  
Kaiserslautern

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Versuche zur Proteinsekretion bei *Escherichia coli*: SecB“ eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Kaiserslautern, den 03.04.2017

---

Anja Baron