

BestMasters

Sascha Herwig

# $\beta$ -Strang-Ausbildung eines Faltungsinter- mediates von BamA

Adsorption an Lipidmembranen  
induziert lokale Sekundärstruktur  
in  $\beta$ -Strang 9



Springer Spektrum

---

# BestMasters

Mit „**BestMasters**“ zeichnet Springer die besten Masterarbeiten aus, die an renommierten Hochschulen in Deutschland, Österreich und der Schweiz entstanden sind. Die mit Höchstnote ausgezeichneten Arbeiten wurden durch Gutachter zur Veröffentlichung empfohlen und behandeln aktuelle Themen aus unterschiedlichen Fachgebieten der Naturwissenschaften, Psychologie, Technik und Wirtschaftswissenschaften. Die Reihe wendet sich an Praktiker und Wissenschaftler gleichermaßen und soll insbesondere auch Nachwuchswissenschaftlern Orientierung geben.

Springer awards “**BestMasters**” to the best master’s theses which have been completed at renowned Universities in Germany, Austria, and Switzerland. The studies received highest marks and were recommended for publication by supervisors. They address current issues from various fields of research in natural sciences, psychology, technology, and economics. The series addresses practitioners as well as scientists and, in particular, offers guidance for early stage researchers.

Weitere Bände in der Reihe <http://www.springer.com/series/13198>

---

Sascha Herwig

# $\beta$ -Strang-Ausbildung eines Faltungsinter- mediates von BamA

Adsorption an Lipidmembranen  
induziert lokale Sekundärstruktur  
in  $\beta$ -Strang 9

Mit einem Geleitwort von  
Herrn Prof. Dr. Jörg H. Kleinschmidt

 Springer Spektrum

Sascha Herwig  
Fachbereich 10/Biophysik  
Universität Kassel  
Kassel, Deutschland

ISSN 2625-3577

ISSN 2625-3615 (electronic)

BestMasters

ISBN 978-3-658-29028-3

ISBN 978-3-658-29029-0 (eBook)

<https://doi.org/10.1007/978-3-658-29029-0>

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© Der/die Herausgeber bzw. der/die Autor(en), exklusiv lizenziert durch Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, ein Teil von Springer Nature 2020

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von allgemein beschreibenden Bezeichnungen, Marken, Unternehmensnamen etc. in diesem Werk bedeutet nicht, dass diese frei durch jedermann benutzt werden dürfen. Die Berechtigung zur Benutzung unterliegt, auch ohne gesonderten Hinweis hierzu, den Regeln des Markenrechts. Die Rechte des jeweiligen Zeicheninhabers sind zu beachten.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag, noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Springer Spektrum ist ein Imprint der eingetragenen Gesellschaft Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH und ist ein Teil von Springer Nature.

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Abraham-Lincoln-Str. 46, 65189 Wiesbaden, Germany

## Geleitwort

Die Mechanismen des Protein-Einbaus in biologische Membranen interessieren Biochemiker, Biophysiker und Zellbiologen seit mehreren Jahrzehnten. Trotz zahlreicher Fortschritte sind die biophysikalischen Grundlagen der Membranbiogenese, insbesondere des Einbaus von Proteinen in Membranen, auf der Ebene inter- und intramolekularer Wechselwirkungen nicht gut verstanden. Dieses Verständnis ist aber bedeutend, da biologische Membranen ein essenzielles strukturierendes Element aller Zellen und Zellorganellen sind und damit eine Grundvoraussetzung für das Entstehen von Leben darstellen. Biomembranen bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht, die aus einer Vielzahl verschiedener Lipide aufgebaut ist, sowie aus Membranproteinen verschiedenster Struktur und Funktion. Membranproteine können entweder als Transmembranproteine die Membranen komplett durchspannen oder als periphere Proteine an Membranen gebunden sein. Die Transmembranproteine ermöglichen den selektiven Stoffaustausch und Transport zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten sowie zwischen Zellen und ihrer Umgebung, dienen als Enzyme oder der Signalübertragung über Membranen.

Dieses Werk beschreibt die lokale Strukturbildung und Faltung des essenziellen und evolutionär hoch konservierten Transmembranproteins BamA aus *Escherichia coli* (YaeT). BamA ist mit 890 Aminosäureresten die größte Untereinheit des sogenannten  $\beta$ -Fass-Aufbau-Maschinerie Komplexes (engl. „ $\beta$ -barrel assembly machinery complex“, BAM-Komplex), der für die Biogenese der Zellwand von Gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, oder *Salmonella typhimurium* notwendig ist. Die Funktionsweise des BAM-Komplexes sowie die molekularen Funktionen und Mechanismen seiner einzelnen Komponenten sind weitestgehend noch nicht verstanden. BamA ist das einzige Transmembranprotein des BAM-Komplexes und bildet in *E. coli* einen Anker für die peripheren vier Untereinheiten des Komplexes.

Die hier vorgestellten Forschungsarbeiten an Modellsystemen analysieren mit biochemischen, biophysikalischen und spektroskopischen Methoden unter welchen Bedingungen die lokale Struktur in  $\beta$ -Strang 9 des BamA ( $\beta$ 9) ausgebildet wird. Die in dieser Masterarbeit dokumentierten Daten zeigen in beispielhafter Weise die Ausbildung von lokaler Sekundärstruktur  $\beta$ 9 des BamA, während dieses an der Oberfläche der Lipidmembran adsorbiert und als Faltungsintermediat noch nicht vor Proteolyse geschützt ist. Für die systematische Untersuchung der

Strukturbildung in  $\beta 9$  des BamA wird zunächst die Präparation von Plasmiden beschrieben, die für die Expression und Isolation von Einzel-Cystein-Mutanten des BamA notwendig sind, in denen jeweils einer der 8 aufeinander folgenden Aminosäurereste der Transmembranregion von  $\beta 9$  durch einen Cystein-Rest ersetzt ist. Diese Mutanten werden nach der Expression durch Anionen-Austauschchromatographie gereinigt und mit einem Fluoreszenzmarker an den einzelnen Cystein-Resten markiert. Die Fluoreszenz des Markers hängt von der Polarität seiner Umgebung ab, was zur Analyse der lokalen Sekundärstruktur ausgenutzt wird. Mit Proteolyse-Tests und Circular dichroismus-Spektroskopie wird gezeigt, dass diese markierten Einzel-Cystein-Mutanten des BamA in Modellmembranen einbauen und dabei native Sekundärstruktur entwickeln. Des Weiteren werden Faltungszwischenstufen in wässriger Umgebung in Abwesenheit von Membranen oder aber in Gegenwart von Modellmembranen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung bei verschiedenen Temperaturen während der Faltung fluoreszenzspektroskopisch charakterisiert. Dabei werden Intermediate des BamA in membranadsorbierter Form für die 8 Mutanten nachgewiesen. Die Fluoreszenzdaten der markierten Mutanten bestätigen die erwartete alternierende Struktur (Exposition zur Membran bzw. zur wässrigen Phase) in der Orientierung von Aminosäureseitenketten in  $\beta 9$  nach erfolgter Faltung bzw. dem Membraneinbau.

Die wesentliche neue wissenschaftliche Erkenntnis ist hier, dass diese alternierende Ausrichtung der Seitenketten bereits in Faltungsintermediaten im  $\beta 9$  des BamA eingenommen wird, die an die Oberfläche von Membranen adsorbieren. Interessanterweise zeigt die wässrige Zwischenstufe bei der BamA-Faltung größtenteils auch die typische Charakteristik für eine Inside-out Struktur der Fass-Domäne des BamA, die zwar theoretisch vorhergesagt, aber bislang noch nicht experimentell beschrieben ist.

Hier ist eine hervorragende Studie dokumentiert und das vorliegende Werk ist ein sehr guter Beitrag zum Stand der Forschung über die Faltung von BamA und die Ausbildung lokaler Sekundärstrukturen eines Proteins an der Oberfläche von Membranen. Der Text ist klar gegliedert, gut geschrieben und bedeutend für die weitere Forschung zu Themen der Membranproteinfaltung.

Prof. Dr. Jörg H. Kleinschmidt  
Leiter der Biophysik, Universität Kassel

## **Profil des Lehrstuhls Biophysik der Universität Kassel**

Der Lehrstuhl Biophysik der Universität Kassel untersucht Biochemie und Biophysik von Membranproteinen und Membranen, die ein wesentliches strukturierendes Element von Zellen und Zellorganellen darstellen. Schwerpunkte bestehen in Untersuchungen zur Membran-Insertion, zur Faltung und zur Stabilität von Membranproteinen. Ein Hauptziel des Arbeitskreises ist es, ein besseres Verständnis der Mechanismen und der physikalischen Grundlagen bzw. Prinzipien der Membranproteinfaltung zu erlangen. Ein weiterer Fokus besteht darin, den Transport und die Wechselwirkungen entfalteter Membranproteine mit molekularen Chaperonen und anderen Faltungshelferproteinen in wässriger Lösung und in Membranen zu erforschen.

Zur Untersuchung von Membranen und Proteinen verwendet die Abteilung Biophysik der Universität Kassel molekularbiologische, biochemische und biophysikalischen Methoden. Membranproteine und deren Punktmutanten werden zunächst überexprimiert und isoliert, um ihre strukturellen Eigenschaften und ihre Funktion in Modellmembranen, d.h. Lipid-Doppelschichten von ausgewählter Lipid- und Proteinzusammensetzung, zu untersuchen. Das Team benutzt eine Reihe von biochemischen und biophysikalischen Methoden, wie ortsgerechte spektroskopische Markierung von Membranproteinen und Spektroskopie, um die Struktur, Kinetik und Thermodynamik der Proteine zu analysieren. Fluoreszenz, Elektronenspinresonanz, oder Circular dichroismus Verfahren werden verwendet, um Proteine, Membranproteinfaltung, sowie Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen zu erforschen. Einzelkanalleitfähigkeits-Aufzeichnungen werden verwendet, um die Funktion von Transmembranproteinen als Transporter für gelöste Stoffe zu untersuchen.

Integrale Membranproteine sind in der Regel sehr hydrophob und in Wasser unlöslich. Daher ist es notwendig, experimentell zugängliche Modellsysteme für Untersuchungen an Membranprotein zu etablieren und die Membranproteinfaltung zu untersuchen. Ob dies möglich ist, hängt stark von den Eigenschaften eines Membranproteins ab. Manche Membranproteine lassen sich in einen entfalteten Zustand in einer Lösung bestimmter Denaturierungsmittel wie Guanidiniumchlorid oder Harnstoff überführen. Aus solchen Lösungen können Proteine durch Verdünnung des Denaturierungsmittels zurückgefaltet werden. Dieses Verfahren wird verwendet, um die Prinzipien des Membranproteineinbaus, der Faltung und

der Stabilität von Proteinen in Membranen zu untersuchen, sowie Wechselwirkungen von molekularen Chaperonen mit Membranproteinen zu analysieren. Darüber hinaus entwickelt die Abteilung neue spektroskopische Methoden, wie Verfahren der ortsgerichteten Fluoreszenzlöschung in Proteinen.

**Kontakt:**

Prof. Dr. Jörg H. Kleinschmidt

FG Biophysik - AVZ-II-2249

Institut für Biologie

Universität Kassel

Heinrich Plett Str. 40

D-34132 Kassel

[jhk@uni-kassel.de](mailto:jhk@uni-kassel.de)

URL: <http://www.membranproteine.net>