

**Analyse der Proteinqualitätskontrolle  
in der bakteriellen Zellhülle von *E. coli***

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Yvonne van Bürk

geb. von der Gathen

aus Oberhausen

August 2019

## I. Angaben zur Prüfung

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Zentrum für medizinische Biotechnologie (ZMB) in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie II, Prof. Dr. Michael Ehrmann, an der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Ehrmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Kaiser

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Peter Bayer

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2019

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online



UNIVERSITÄT  
D U I S B U R G  
E S S E N

*Offen im Denken*



**ub** | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird über DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:**     10.17185/duepublico/70816  
**URN:**     urn:nbn:de:hbz:464-20191213-100518-2

Alle Rechte vorbehalten.

## II. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Angaben zur Prüfung .....</b>	<b>II</b>
<b>II. Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>III. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>IV. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>V. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der Modellorganismus <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Zellhülle von <i>E. coli</i> .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Innenmembran.....	2
1.2.2 Außenmembran .....	3
1.2.3 Periplasma .....	4
<b>1.3 Proteinqualitätskontrolle im Periplasma .....</b>	<b>5</b>
1.3.1 SigmaE-abhängiger Signalweg.....	6
1.3.2 Cpx-System .....	8
<b>1.4 Faltungsfaktoren im Periplasma.....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Molekulare Chaperone.....	10
1.4.1.1 Skp.....	11
1.4.1.2 Spy.....	12
1.4.2 Faltungskatalysatoren.....	13
1.4.2.1 Prolinisomerasen .....	13
1.4.2.1.1 SurA.....	14
1.4.2.1.2 PpiD .....	15
1.4.2.1.3 FkpA.....	16
1.4.2.2 Oxidoreduktasen, insbesondere DsbA .....	16
1.4.3 Proteasen.....	19
1.4.3.1 Serinproteasen.....	19
1.4.3.1.1 DegP .....	20
1.4.3.1.2 DegQ.....	22
1.4.3.1.3 Prc.....	23
1.4.3.2 Metalloproteasen .....	24
1.4.3.2.1 PtrA.....	24
1.4.3.2.2 BepA .....	25
<b>1.5 Genetische Daten und Phänotypen von Doppelmutanten.....</b>	<b>26</b>

<b>1.6 Zielsetzung .....</b>	<b>28</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>30</b>
2.1.1 Allgemeines und Chemikalien.....	30
2.1.2 Nährmedien .....	31
2.1.3 Antibiotika und weitere Medienzusätze.....	31
2.1.4 Bakterienstämme .....	32
2.1.5 Vektoren und Plasmide.....	33
2.1.6 Oligonukleotide .....	34
2.1.7 Aktivatorpeptide .....	35
2.1.8 Antikörper.....	35
2.1.9 Enzyme, Größenstandards, Proteine & Substrate.....	36
2.1.10 Komplettsysteme .....	37
2.1.11 Allgemeine Instrumentation .....	37
2.1.12 Sonstige Verbrauchsmaterialien .....	38
2.1.13 Software.....	39
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>39</b>
2.2.1 Mikrobiologische Methoden .....	39
2.2.1.1 Lagerung von Plasmiden .....	39
2.2.1.2 Lagerung von Stämmen.....	39
2.2.1.3 Ausstreichen von Bakterienstämmen .....	40
2.2.1.4 Anzucht von Flüssigkulturen.....	40
2.2.1.5 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen .....	40
2.2.1.6 Transformation.....	40
2.2.1.6.1 Hitzeschocktransformation und Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	41
2.2.1.6.2 TSS-Transformation.....	42
2.2.1.7 Produktion der verwendeten Proteine in E. coli .....	42
2.2.1.8 Bakterienzelllagerung und -aufschluss .....	45
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>45</b>
2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	46
2.3.1.1 Analytische Plasmidpräparation (Mini-Präp).....	46
2.3.1.2 Präparative Plasmidpräparation (Midi-Prep).....	46
2.3.2 PCR .....	46
2.3.2.1 Präparative PCR .....	47
2.3.2.2 Analytische PCR (Kolonie-PCR).....	47
2.3.3 Oligomutagenese.....	48
2.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	48
2.3.5 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten .....	49
2.3.6 Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten .....	49

<b>2.4 Biochemische Methoden</b> .....	<b>50</b>
2.4.1 Allgemeine Angaben zu Proteinreinigungen.....	50
2.4.1.1 Affinitätschromatographie .....	51
2.4.1.2 Anionenaustauschchromatographie .....	51
2.4.1.3 Größenausschlusschromatographie .....	51
2.4.1.4 Ultrafiltration .....	51
2.4.2 Reinigung der verwendeten Proteine aus Doppelmutanten .....	52
2.4.3 Reinigung der verwendeten Proteine aus BW30270 und SoluBL21 .....	53
2.4.3.1 Reinigung von DsbAP151T, PpiD und SurA aus BW30270 .....	53
2.4.3.2 Reinigung von EfeB aus SoluBL21 .....	56
2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	56
2.4.5 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	57
2.4.6 Coomassie-Färbung .....	58
2.4.7 Silberfärbung.....	59
2.4.8 Western Blot-Analyse und Immundetektion.....	59
2.4.9 <i>Crosslink</i> Methode mittels Glutaraldehyd .....	60
2.4.10 Degradationsassays .....	61
2.4.11 Acetonfällung .....	62
2.4.12 Massenspektrometrische Analysen .....	63
2.4.12.1 Massenspektrometrische Analysen von an Proteine der Proteinqualitätskontrolle gebundenen Proteinen .....	63
2.4.12.2 Massenspektrometrische Analyse von Peptidfragmenten .....	63
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>65</b>
<b>3.1 Konstruktion der Plasmide</b> .....	<b>66</b>
<b>3.2 Proteinreinigungen aus Deletionsmutanten unter Stressbedingungen und massenspektrometrische Analysen</b> .....	<b>67</b>
3.2.1 DegPSA aus <i>degP</i> -Mutanten.....	67
3.2.1.1 Proteinreinigung von DegPSA aus JB48 .....	67
3.2.1.2 Proteinreinigung von DegPSA aus JB48 unter SDS/EDTA-Stress.....	70
3.2.1.3 Proteinreinigung von DegPSA aus JB53 .....	71
3.2.1.4 Proteinreinigung von DegPSA aus JB26 .....	72
3.2.1.5 Massenspektrometrische Analysen von DegPSA aus <i>degP</i> -Mutanten .....	74
3.2.2 PrcSA aus JB53.....	76
3.2.2.1 Proteinreinigung von PrcSA aus JB53.....	76
3.2.2.2 Massenspektrometrische Analyse von PrcSA aus JB53 .....	78
3.2.3 PpiD aus JB26 .....	79
3.2.3.1 Proteinreinigung von PpiD aus JB26 .....	79
3.2.3.2 Massenspektrometrische Analyse von PpiD aus JB26.....	81
3.2.4 DsbA und DsbAPT aus <i>dsbA</i> -Mutanten.....	82

3.2.4.1	Proteinreinigung von DsbA aus JB48 .....	82
3.2.4.2	Proteinreinigung von DsbA aus JB60 .....	84
3.2.4.3	Proteinreinigung von DsbAPT aus JB48.....	86
3.2.4.4	Proteinreinigung von DsbAPT aus JB60.....	88
3.2.4.5	Massenspektrometrische Analysen von DsbA/DsbAPT aus <i>dsbA</i> -Doppelmutanten.....	89
3.2.5	SurA aus <i>surA</i> -Mutanten.....	91
3.2.5.1	Proteinreinigung von SurA aus JB60 .....	91
3.2.5.2	Proteinreinigung von SurA aus JB65 .....	93
3.2.5.3	Proteinreinigung von SurA aus JB63 .....	96
3.2.5.4	Massenspektrometrische Analysen von SurA aus <i>surA</i> -Doppelmutanten.....	98
3.2.6	BepAEQ aus JB65 .....	99
3.2.6.1	Proteinreinigung von BepAEQ aus JB65 .....	99
3.2.6.2	Massenspektrometrische Analyse von BepAEQ aus JB65 .....	101
3.2.7	PtrAEQ aus JB63.....	102
3.2.7.1	Proteinreinigung von PtrAEQ aus JB63.....	102
3.2.7.2	Massenspektrometrische Analyse von PtrAEQ aus JB63 .....	104
3.2.8	Überprüfung der Kompensation durch DegQSA aus <i>degP</i> -Mutanten .....	105
3.2.8.1	Proteinreinigung von DegQSA aus JB48.....	105
3.2.8.2	Proteinreinigung von DegQSA aus JB53.....	107
3.2.8.3	Proteinreinigung von DegQSA aus JB26.....	109
3.2.8.4	Massenspektrometrische Analysen von DegQSA aus <i>degP</i> -Doppelmutanten .....	110
<b>3.3</b>	<b>Proteinreinigungen für Degradationsassays .....</b>	<b>112</b>
3.3.1	Reinigung des Substrats EfeB .....	112
3.3.2	Reinigung verschiedener Faltungshelfer .....	113
3.3.2.1	Reinigung von DsbAPT.....	113
3.3.2.2	Reinigung von PpiD .....	117
3.3.2.3	Reinigung von SurA.....	121
<b>3.4</b>	<b>Degradationsassays .....</b>	<b>123</b>
3.4.1	Etablierung der Degradationsassays .....	124
3.4.2	Degradationsassays mit Faltungshelfern.....	124
3.4.2.1	DegP-Degradationsassays mit verschiedenen Faltungshelfern .....	125
3.4.2.2	DegQ-Degradationsassays mit verschiedenen Faltungshelfern.....	129
3.4.2.3	Prc-Degradationsassays mit verschiedenen Faltungshelfern.....	133
3.4.3	Protektionsmuster der Faltungsfaktoren in den Degradationsassays.....	137
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>140</b>
4.1	<b>Organisation des Netzwerks der periplasmatischen Proteinqualitäts-</b> <b>kontrolle .....</b>	<b>140</b>
4.2	<b>Schlüsselspieler und Enzyme mit enger Substratspezifität .....</b>	<b>141</b>
4.3	<b>Vernetzung der Proteinqualitätskontrolle.....</b>	<b>143</b>

4.4	Verständnis von möglichen Interaktionen der Faltungshelfer in der Stressantwort .....	147
4.5	Ausblick .....	151
5	Zusammenfassung .....	153
5.1	Summary .....	155
6	Literaturverzeichnis .....	157
7	Anhang .....	171
8	Danksagung .....	179
9	Eidesstattliche Erklärung .....	181
10	Lebenslauf .....	182

### III. Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
$\alpha$	Alpha
ABC	Ammoniumbicarbonat
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
AHT	Anhydrotetrazyklin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
$\beta$	Beta
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
Cam	Chloramphenicol
$\Delta$	Delta; Differenz
Da	Dalton [g/mol]
DE	Deutschland
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
DTT	1,4-Dithioerythritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	<i>formic acid</i> (Ameisensäure)
FKBP	FK506-bindende Proteine
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm; Gravitationskonstante (9,81 m/s)
GA	Glutaraldehyd
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde(n)



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IAM	Iodacetamid
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo ( $10^3$ )
Kan	Kanamycin
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LEW	<i>Lysis-Equilibration-Wash</i>
LPS	Lipopolysaccharid
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
m	Milli ( $10^{-3}$ )
M	Molar [mol/l], Mega ( $10^6$ )
min	Minute(n)
MCS	<i>multiple cloning site(s)</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> (Ausschlussvolumen)
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Ni-TED	Nickel-Tris-Carboxymethylethylenediamin
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
nm	Nanometer
NZA	NZ-Amin
OD	optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein(s)</i> (Außenmembranprotein(e))
$\Phi$	Phi
%	Prozent
p. a.	<i>pro analysi</i> (analysenrein)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
rpm	<i>revolution per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
$\sigma$	Sigma
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
Spec	Spectinomycin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAT	Twin-Arginin-Transportsystem
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tet	Tetrazyklin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSS	<i>transformation and storage solution</i>
ün	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumenprozent ( <i>volume per volume</i> )
w/v	Gewichtsprozent ( <i>weight per volume</i> )

### Aminosäuren

Aminosäuren bzw. Basen und Nukleotide werden entsprechend der Empfehlungen der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) und der *International Union of Biochemistry* (IUB) im Ein- oder Dreibuchstabencode angegeben (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. A one-letter notation for amino acid sequences. Tentative rules, 1969; Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their components. Recommended rules for 1970, 1970).

## IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der Zellhülle von <i>E. coli</i> .....	2
Abbildung 1.2: SigmaE-abhängiger Signalweg in <i>E. coli</i> .....	6
Abbildung 1.3: Das Zweikomponentensystem Cpx in <i>E. coli</i> .....	8
Abbildung 1.4: Überblick einiger Chaperone und Faltungsfaktoren der Proteinfaltung im Periplasma von <i>E. coli</i> .....	10
Abbildung 1.5: Die dreidimensionale Struktur von Skp und mögliche Formen der Skp-OMP- Komplexe.....	11
Abbildung 1.6: Kristallstruktur des periplasmatischen Chaperons Spy .....	12
Abbildung 1.7: Kristallstrukturen der Prolinisomerasen SurA und FkpA.....	14
Abbildung 1.8: Disulfidbrückenbildung im Periplasma von <i>Escherichia coli</i> .....	18
Abbildung 1.9: Strukturen des Hexamers und 24mers von DegP .....	21
Abbildung 1.10: Struktur vom 24mer von DegQ und die katalytische Triade .....	22
Abbildung 1.11: Kristallstruktur der periplasmatischen Metalloprotease PtrA .....	25
Abbildung 1.12: Übersicht über synthetische Phänotypen .....	27
Abbildung 3.1: Schematische lineare Darstellung der Plasmide .....	66
Abbildung 3.2: Reinigung von DegPSA aus JB48 ( <i>degP dsbA</i> ) .....	68
Abbildung 3.3: Vorbereitung von DegPSA aus JB48 zur massenspektrometrischen Analyse ...	69
Abbildung 3.4: Vorbereitung von DegPSA aus JB53 zur massenspektrometrischen Analyse ...	71
Abbildung 3.5: Vorbereitung von DegPSA aus JB26 zur massenspektrometrischen Analyse ...	73
Abbildung 3.6: Vorbereitung von PrcSA aus JB53 zur massenspektrometrischen Analyse .....	77
Abbildung 3.7: Vorbereitung von PpiD aus JB26 zur massenspektrometrischen Analyse .....	80
Abbildung 3.8: <i>Crosslink</i> der gepoolten Probe 38 von PpiD aus JB26.....	81
Abbildung 3.9: Vorbereitung von DsbA aus JB48 zur massenspektrometrischen Analyse.....	83
Abbildung 3.10: Vorbereitung von DsbA aus JB60 zur massenspektrometrischen Analyse.....	85
Abbildung 3.11: Vorbereitung von DsbAPT aus JB48 zur massenspektrometrischen Analyse .	87
Abbildung 3.12: Vorbereitung von DsbAPT aus JB60 zur massenspektrometrischen Analyse .	89
Abbildung 3.13: Vorbereitung von SurA aus JB60 zur massenspektrometrischen Analyse .....	92
Abbildung 3.14: Vorbereitung von SurA aus JB65 zur massenspektrometrischen Analyse .....	94
Abbildung 3.15: Western Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion von SurA aus JB65 .....	95
Abbildung 3.16: Vorbereitung von SurA aus JB63 zur massenspektrometrischen Analyse .....	97
Abbildung 3.17: Vorbereitung von BepAEQ aus JB65 zur massenspektrometrischen Analyse .....	100
Abbildung 3.18: Vorbereitung von PtrAEQ aus JB63 zur massenspektrometrischen Analyse	103
Abbildung 3.19: Vorbereitung von DegQSA aus JB48 zur massenspektrometrischen Analyse .....	106

<b>Abbildung 3.20: Vorbereitung von DegQSA aus JB53 zur massenspektrometrischen Analyse</b>	<b>108</b>
<b>Abbildung 3.21: Vorbereitung von DegQSA aus JB26 zur massenspektrometrischen Analyse</b>	<b>109</b>
<b>Abbildung 3.22: Schritte der EfeB-Reinigung</b>	<b>113</b>
<b>Abbildung 3.23: Induktion und Affinitätschromatographie der DsbAPT-Reinigung aus BW30270</b>	<b>114</b>
<b>Abbildung 3.24: SEC und Konzentrationsbestimmung von DsbAPT aus BW30270</b>	<b>116</b>
<b>Abbildung 3.25: Induktion und Affinitätschromatographie der PpiD-Reinigung aus BW30270</b>	<b>118</b>
<b>Abbildung 3.26: Affinitätschromatographie und SEC von PpiD aus BW30270</b>	<b>119</b>
<b>Abbildung 3.27: Anionenaustauschchromatographie und Konzentrationbestimmung von PpiD aus BW30270</b>	<b>120</b>
<b>Abbildung 3.28: Induktion und Affinitätschromatographie der SurA-Reinigung aus BW30270</b>	<b>122</b>
<b>Abbildung 3.29: SEC und Konzentrationsbestimmung von SurA aus BW30270</b>	<b>123</b>
<b>Abbildung 3.30: Einsatz von Faltungshelfern im DegP-Degradationsassay</b>	<b>125</b>
<b>Abbildung 3.31: Korrelationskoeffizienten nach Pearson für DegP-Degradationsassays</b>	<b>127</b>
<b>Abbildung 3.32: Schnitte durch die Protease DegP über die native Sequenz von EfeB</b>	<b>128</b>
<b>Abbildung 3.33: Einsatz von Faltungshelfern im DegQ-Degradationsassay</b>	<b>130</b>
<b>Abbildung 3.34: Korrelationskoeffizienten nach Pearson für DegQ-Degradationsassays</b>	<b>131</b>
<b>Abbildung 3.35: Schnitte durch die Protease DegQ über die native Sequenz von EfeB</b>	<b>132</b>
<b>Abbildung 3.36: Einsatz von Faltungshelfern im Prc-Degradationsassay</b>	<b>134</b>
<b>Abbildung 3.37: Korrelationskoeffizienten nach Pearson für Prc-Degradationsassays</b>	<b>135</b>
<b>Abbildung 3.38: Schnitte durch die Protease Prc über die native Sequenz von EfeB</b>	<b>136</b>
<b>Abbildung 3.39: Protektionsmuster der Faltungsfaktoren in den Degradationsassays</b>	<b>138</b>
<b>Abbildung 4.1: Herleitung und Möglichkeiten der Komplexbildung von Enzymen und Substrat</b>	<b>149</b>

## V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien .....	30
Tabelle 2.2: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer .....	31
Tabelle 2.3: Liste und Konzentrationen der verwendeten Antibiotika .....	32
Tabelle 2.4 Bakterienstämme .....	32
Tabelle 2.5: Deletionsstämme .....	33
Tabelle 2.6: Verwendete Vektoren und Plasmide .....	33
Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Oligonukleotide.....	34
Tabelle 2.8: Verwendete Aktivatorpeptide .....	35
Tabelle 2.9: Verwendete Primärantikörper.....	35
Tabelle 2.10: Verwendete Sekundärantikörper.....	35
Tabelle 2.11: Liste der verwendeten Enzyme und Proteasen .....	36
Tabelle 2.12: Liste verwendeter Größenstandards .....	36
Tabelle 2.13: Liste der verwendeten gereinigten Proteine .....	36
Tabelle 2.14: Liste der verwendeten Protein- und Peptidsubstrate .....	36
Tabelle 2.15: Liste der verwendeten Komplettsysteme .....	37
Tabelle 2.16: Liste der verwendeten Software.....	39
Tabelle 2.17: Bedingungen zur Produktion der verschiedenen Proteine aus Doppelmutanten..	44
Tabelle 2.18: Bedingungen zur Produktion der verschiedenen Proteine aus BW30270 und SoluBL21 .....	44
Tabelle 2.19: Liste der verwendeten Affinitätstags und Säulenmaterialien .....	51
Tabelle 2.20: Zusammensetzung für zehn SDS-Gele .....	58
Tabelle 2.21: Ansatzschema für einen Degradationsassay mit Aktivatorpeptid am Beispiel DegP .....	62
Tabelle 3.1: Ausgewählte Deletionsstämme und Stressbedingungen.....	65
Tabelle 3.2: Die 20 häufigsten Ergebnisse der LC-MS-Analyse der DegPSA-Reinigungen aus den Doppel-KO-Stämmen .....	75
Tabelle 3.3: Die 20 häufigsten Ergebnisse der LC-MS-Analyse der PrcSA-Reinigung aus JB5378	
Tabelle 3.4: Die Ergebnisse der LC-MS-Analyse der PpiD-Reinigung aus JB26 .....	82
Tabelle 3.5: Die 20 häufigsten Ergebnisse der LC-MS-Analyse der DsbA/DsbAPT-Reinigungen aus den Doppel-KO-Stämmen .....	90
Tabelle 3.6: Die 20 häufigsten Ergebnisse der LC-MS-Analyse der SurA-Reinigungen aus den Doppel-KO-Stämmen.....	98
Tabelle 3.7: Die Ergebnisse der LC-MS-Analyse der BepAEQ-Reinigung aus JB65 .....	102
Tabelle 3.8: Die Ergebnisse der LC-MS-Analyse der PtrAEQ-Reinigung aus JB63 .....	104
Tabelle 3.9: Die 20 häufigsten Ergebnisse der LC-MS-Analyse der DegQSA-Reinigungen aus den <i>degP</i> -KO-Stämmen.....	111

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 4.1: Vergleich der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen.....</b>	<b>144</b>
<b>Tabelle 7.1: Ergebnisse der LC-MS-Analyse der Proteinreinigungen aus den Doppel-KO- Stämmen.....</b>	<b>171</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Modellorganismus *Escherichia coli*

Aufgrund seiner kurzen Generationsdauer, des komplett entschlüsselten Genoms und der einfachen Kultivierung gilt das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) als einer der Modellorganismen für die biologische und biomedizinische Grundlagenforschung (Antranikian, 2006).

*E. coli* wurde von dem Kinderarzt Theodor Escherich im Jahr 1885 erstmals charakterisiert (Oberbauer, 1992), gehört zu der Familie der *Enterobacteriaceae* und wurde als fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium klassifiziert. Das Genom besteht aus einer zirkulären DNA mit 4,63 Mb, die für etwa 4300 Proteine kodiert. Der natürliche Lebensraum von *E. coli* ist die Darmwand von homoiothermen Organismen, einschließlich des Menschen (Fuchs *et al.*, 2014; Madigan *et al.*, 2012). Pathogene Stämme können unter anderem Diarrhö, Urogenitalinfektionen und Lebensmittelvergiftungen verursachen (Fuchs *et al.*, 2014). In der Mikrobiologie wird vor allem der apathogene Wildtypstamm K12 zur Untersuchung verschiedener genetischer, biochemischer und molekularbiologischer Eigenschaften genutzt, der für den gesunden Menschen ungefährlich ist (Antranikian, 2006; Fuchs *et al.*, 2014).

Bakterien können, neben der Morphologie, aufgrund der Gram-Färbung (Gram, 1884) taxonomisch in zwei große Gruppen differenziert werden. Begründet in unterschiedlichen Zellwandstrukturen, lassen sich grampositive und gramnegative Bakterien unterscheiden. Während bei gramnegativen Bakterien ein Farbstoff-Jod-Komplex im Zuge der Gram-Färbung aus der Zellwand durch Ethanol extrahiert wird, bleiben grampositive Bakterien nach diesem Schritt dauerhaft angefärbt. Begründet ist dies in der durchgehenden Zellwand grampositiver Bakterien, wobei einer Membran eine dicke Peptidoglykanschicht aufgelagert ist. Die Zellhülle von gramnegativen Bakterien, zu denen der Modellorganismus *E. coli* gehört, unterscheidet sich hiervon grundlegend (siehe 1.2).

## 1.2 Die Zellhülle von *E. coli*

Bei gramnegativen Bakterien setzt sich die Zellhülle aus der Innenmembran, dem Periplasma und der Außenmembran zusammen (Abbildung 1.1).

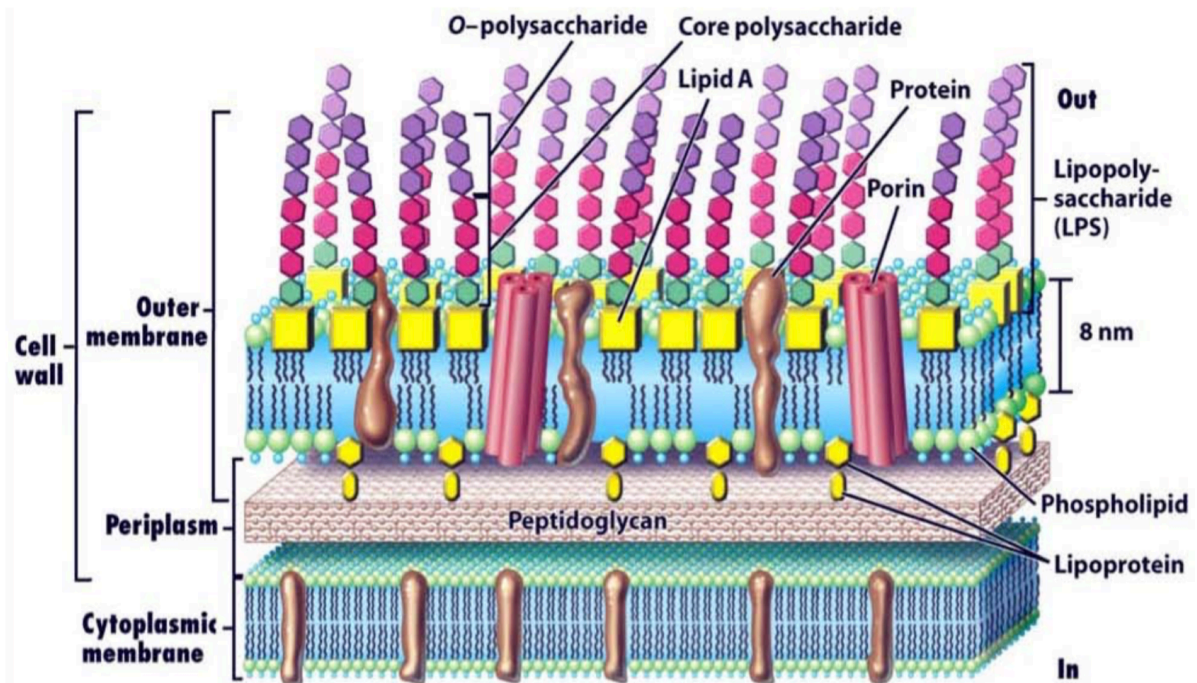


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der Zellhülle von *E. coli*

Die asymmetrisch aufgebaute Außenmembran bestehend aus Lipopolysacchariden und Phospholipiden, sowie die aus Phospholipiden aufgebaute Innenmembran begrenzen den dazwischen liegenden periplasmatischen Raum, der das Peptidoglykan enthält (Madigan *et al.*, 2006).

Im Hinblick auf die Untersuchung der Proteinqualitätskontrolle bietet sich die Zellhülle von *E. coli* als geeignetes Modell an, da die meisten in Faltungsprozesse involvierten Proteine im Periplasma ATP-unabhängig und nicht essentiell sind.

### 1.2.1 Innenmembran

Die Innenmembran, auch Cytoplasmamembran genannt, grenzt das Cytoplasma zum Periplasma ab und stellt eine hochselektive Barriere dar, welche für ungeladene, lipophile Moleküle permeabel ist. Sie besteht aus einer 8 nm dicken, symmetrischen Phospholipiddoppelschicht, in die zahlreiche Proteine eingebettet sind (Nou und Kadner, 1998; Sato *et al.*, 1977). Innenmembranproteine durchspannen die Membran meist in Form hydrophober  $\alpha$ -Helices. Da die Membran für hydrophile Substanzen eher undurchlässig ist, wird durch hochspezifische



cytoplasmatische Membranproteine der Im- und Export dieser gesteuert (Boyd *et al.*, 1987; Boyd *et al.*, 1998; Driessen und Nouwen, 2008; Lee *et al.*, 2006). Der Cytoplasmamembran ist eine weitere wichtige Funktion zuzuschreiben. Da in ihr Strukturen der Atmungskette und der elektrochemischen Gradientenpumpe verankert sind, dient sie vor allem auch der Energieerzeugung und -speicherung.

### 1.2.2 Außenmembran

Zusätzlich zur Innenmembran weisen gramnegative Bakterien eine Außenmembran auf. Durch diese wird das Bakterium vor schädlichen Einflüssen bewahrt, da die Membran als Permeabilitätsbarriere für hydrophobe Substanzen gegenüber der Umwelt fungiert (Nikaido, 2003; Nikaido und Vaara, 1985). Im Gegensatz zur Innenmembran ist die Außenmembran asymmetrisch aufgebaut. Sie setzt sich aus einer inneren Phospholipidschicht und einer äußeren Lipopolysaccharidschicht zusammen (Mühlradt und Golecki, 1975). Die amphipatischen Lipopolysaccharide (LPS) sind zur Außenseite der Zelle gerichtet und bestehen aus einem hydrophoben Teil, dem Lipid A, und einem hydrophilen Teil aus verschiedenen Zuckerbestandteilen. Die LPS dienen unter anderem als Phagenrezeptoren oder können in Pathogenen teilweise Antigenfunktionen aufweisen.

Auch bei den in die Membran eingelagerten Proteinen gibt es deutliche Unterschiede zu denen der Innenmembran. Die Außenmembranproteine (OMP (*outer membrane protein*)) sind in Form antiparalleler  $\beta$ -Faltblätter aufgebaut, die zylindrische Fässer mit hydrophilem Kanal bilden (Koebnik, 1996). Dabei handelt es sich meistens um trimere Porine, welche die passive Diffusion kleiner hydrophiler Moleküle, wie Nährstoffen, bis ca. 600 kDa ermöglichen (Mogensen und Otzen, 2005). Neben den Porinen handelt es sich bei den Außenmembranproteinen um Komponenten von Export-Maschinen, die beispielsweise an der Sekretion von Proteinen oder Toxinen beteiligt sind, sowie um Proteasen, Lipasen oder Glucosidasen. Beispiele solcher Proteine sind OmpA, OmpC, OmpF, LamB und PhoE (Barbas *et al.*, 1985; Baslé *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 1984; Kleinschmidt, 2003; Koebnik, 1996; Ringler und Schulz, 2002; Smith *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2008). Neben den OMP enthält die Außenmembran Lipoproteine, die als Verbindungsglieder zwischen Außenmembran und Peptidoglykan dienen. Diese vermitteln Veränderungen im Umgebungsdruck, wodurch Anpassungen innerhalb des Periplasmas stattfinden und Beschädigungen der Zelle verhindert werden können (Koch, 1998). Bis zum Jahr

2005 konnten in der Außenmembran von *E. coli* um die 320 Proteine identifiziert werden (Ehrmann, 2005).

### 1.2.3 Periplasma

Der Bereich zwischen der Außen- und der Innenmembran wird als periplasmatischer Raum definiert. Unter normalen osmotischen Bedingungen ist dieser Bereich ca. 50 nm dick und macht etwa 30 % des Zellvolumens aus (van Wielink und Duine, 1990; Wülfing und Plückthun, 1994). Eine Peptidoglykanschicht, deren Grundgerüst aus  $\beta$ -1,4-glycosidisch verknüpften N-Acetylglucosamin- und N-Acetylmuraminsäuremolekülen sowie quervernetzenden Tetrapeptiden aufgebaut ist, trägt hauptsächlich zum Schutz des Bakteriums unter osmotischen Stressbedingungen bei, welche in der natürlichen Umgebung von *E. coli* häufig herrschen. Diese Mureinschicht ist in das gelartige Periplasma eingebettet. Die viskose Konsistenz des Periplasmas ist auf die hohe Konzentration an Proteinen zurückzuführen (Brass *et al.*, 1986). Von den etwa 4300 Proteinen, für die das zirkuläre 4,63 Mb große Genom kodiert, sind ca. 150 im Periplasma lokalisiert (Blattner *et al.*, 1997; Ehrmann, 2005). Dabei handelt es sich um Proteasen, Chaperone und Faltungskatalysatoren, sowie Bestandteile von ABC-Transportern und substratbindende Proteine und Enzyme, die in Virulenz, metabolische Prozesse und Motilität involviert sind (Ehrmann, 2005). Außerdem sind periplasmatische Proteine an der Stressantwort und der Biogenese von Außenmembranproteinen beteiligt. Kurzfristige Änderungen in der Umgebung von *E. coli* können aufgrund der eingelagerten Moleküle im Periplasma abgepuffert werden und dadurch die Zelle schützen (Danese *et al.*, 1998).

Da auch die Proteine der Zellhülle an den Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert werden, müssen sie um ihren Bestimmungsort zu erreichen die Innenmembran passieren. Dafür bedarf es Translokationssystemen, da ein passiver Transport über die Membran nicht möglich ist. Ungefaltete Proteine werden durch das klassische, essentielle und ubiquitäre Sec-System (de Keyzer *et al.*, 2003), bereits gefaltete Proteine häufig über das Twin-Arginin-Transportsystem (TAT) durch die Membran befördert (Lee *et al.*, 2006). Während der TAT-Weg nur etwa 30 Substrate besitzt, nutzen etwa 500 Proteine (STEP database (<http://www.stepdb.eu/index.php>, 04.12.2018; 13:22 Uhr)), darunter alle Außenmembranproteine, das SecYEG-Translokationssystem. Die Translokation wird dabei durch eine spezielle N-terminale Signalsequenz vermittelt, welche nachfolgend im Periplasma abgespalten wird.

### 1.3 Proteinqualitätskontrolle im Periplasma

Aufgrund des, durch unspezifische Porine hervorgerufenen, porösen Charakters der Außenmembran sind die Proteine des Periplasmas den Umweltbedingungen in stärkerem Ausmaß ausgesetzt, als die cytoplasmatischen Proteine. Diese Bedingungen sind beispielsweise Änderungen des pH-Werts, Strahlung, erhöhte Temperaturen, Hyperosmolarität, Detergenzien, oder andere chemische Stressbedingungen. Der Faltungszustand und die Funktionalität der periplasmatischen Proteine werden also durch diese Umweltbedingungen beeinflusst und die Integrität der Zellhülle ist dadurch zunehmend gefährdet.

Fehlfaltungen von Proteinen können durch die Exposition hydrophober Elemente zu Proteinaggregaten und deren Akkumulation führen (Goff und Goldberg, 1985; González-Montalbán *et al.*, 2005). Vor allem, wenn das aggregierte Protein eine essentielle Funktion hat oder die Funktion anderer wichtiger Proteine stört, kann es zum Zelltod führen.

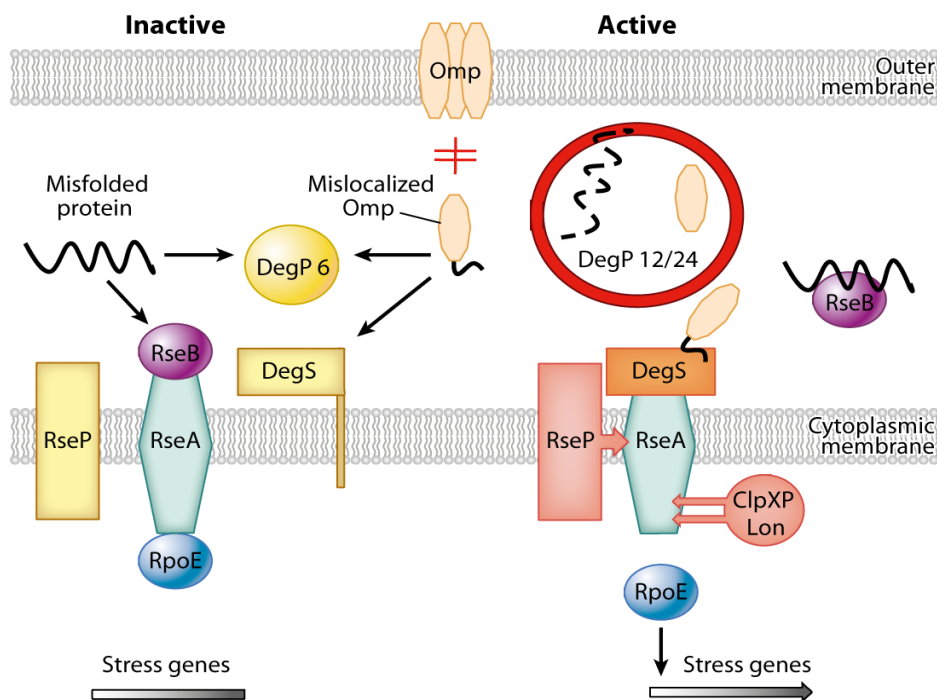
Die Zelle kann durch Chaperone, die ebenfalls die hydrophoben Oberflächen der fehlgefalteten Proteine erkennen, sowie den Einsatz von Faltungskatalysatoren versuchen die Aggregation zu verhindern und bestehende Aggregate aufzulösen. Gelingt dies nicht, können die Proteinaggregate durch Proteasen abgebaut werden (Wang und Tsou, 1998).

Nicht nur im Cytoplasma sind aggregierte Proteine und die Bildung von *inclusion bodies* bei Überproduktion oder Mutation von Proteinen sowie bei Hitzeschock beschrieben (Richter *et al.*, 2010), auch periplasmatische Proteinaggregate wurden identifiziert (Hunke und Betton, 2003; Uhland *et al.*, 2000).

Aus diesem Grund haben bakterielle Zellen effektive Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle entwickelt indem sie durch die Kontrolle des Proteinfaltungszustands die richtige Faltung, Reparatur oder Degradation der Proteine unterstützen. Reguliert wird dies durch spezielle Signalsysteme, welche die Genexpression verschiedener Chaperone, Faltungskatalysatoren und Proteasen an den momentanen Bedarf anpassen. In der Zellhülle von *E. coli* sind die beiden bekanntesten Signalsysteme der SigmaE( $\sigma^E$ )-abhängige Signalweg, sowie das Zweikomponentensystem Cpx (Rowley *et al.*, 2006).

### 1.3.1 SigmaE-abhängiger Signalweg

Zur Anpassung der Genexpression der beteiligten Proteine der Proteinqualitätskontrolle müssen die Stresssignale von der Zellhülle zum cytoplasmatischen Transkriptionssystem übermittleit werden. Dies wird durch eine regulierte proteolytische Kaskade gewährleistet. Der alternative Sigmafaktor RpoE ( $\sigma^E$ ) ist dabei das Schlüsselement des essentiellen  $\sigma^E$ -abhängigen Signalwegs (Abbildung 1.2) (Rowley *et al.*, 2006). Eine bedeutende Rolle spielt dabei auch der Anti-Sigmafaktor RseA. RseA ist ein integrales Innenmembranprotein, das aus einer cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer periplasmatischen Domäne besteht und dessen Aktivität als Anti-Sigmafaktor durch eine proteolytische Aktivierung reguliert wird (Chaba *et al.*, 2007).



**Abbildung 1.2: SigmaE-abhängiger Signalweg in *E. coli***

Unter stressfreien Bedingungen ist der SigmaE-abhängige Signalweg inaktiv. RseB verhindert die Degradation des Anti-Sigmafaktors RseA und die Proteasen DegP, DegS und RseP sind inaktiv. Unter Proteinfaltungsstress wird der Signalweg aktiviert. Der RseA/B-Komplex dissoziiert und DegS wird durch exponierte C-Termini fehllokalisierter Außenmembranproteine (OMP) aktiviert. RseA wird der Reihe nach durch DegS, RseP und ClpXP/Lon degradiert. Dadurch wird RpoE frei und induziert Stresspromotoren. DegP wird durch C-Termini fehlgefalteter Proteine via Oligomerisierung aktiviert und leitet die Substrate den Reparatur- oder Degradationswegen zu (Merdanovic *et al.*, 2011).

Unter stressfreien Bedingungen wird RpoE an die Transmembrandomäne von RseA gebunden und dadurch an der cytoplasmatischen Seite der Innenmembran sequestriert. Durch die Bildung eines Heterooligomers mit dem periplasmatischen Protein RseB (RpoE/RseA/RseB) wird dieser inaktive Zustand stabilisiert.

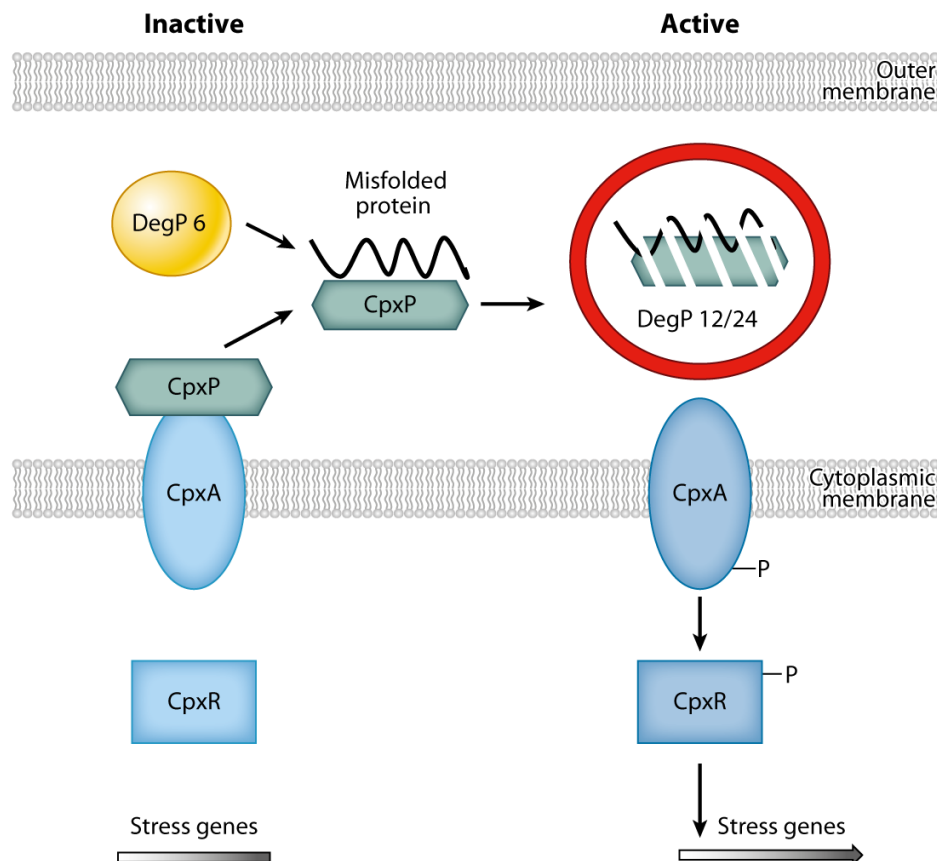
Stressbedingungen, die im Zusammenhang mit fehlgefalteten Proteinen in der Zellhülle stehen, wie zum Beispiel eine erhöhte Expression von OMP oder hohe Temperaturen, lösen die  $\sigma^E$ -Antwort aus (Mecsas *et al.*, 1993). Als Induktionssignal dient dabei eine Anhäufung ungefalteter Außenmembranproteine, die nur im fehlgefalteten Zustand ihre C-Termini präsentieren. Die C-Termini dieser Polypeptide werden von der im Periplasma lokalisierten, membrangebundenen Serinprotease DegS durch Binden an die PDZ-Domänen erkannt und dienen als Aktivator dieser ansonsten durch Autoinhibition inaktiven Protease. Zusätzlich dissoziiert das Regulatorprotein RseB durch die Komplexierung mit fehlgefalteten OMP von RseA (Collinet *et al.*, 2000), wodurch RseA für DegS zugänglich gemacht wird. Im aktiven Zustand führt DegS den initialen Schnitt in der periplasmatischen Domäne von RseA an der Innenmembran zwischen dem Valin 148 und dem Serin 149 ein (Ades *et al.*, 1999; Alba *et al.*, 2002; Alba *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2003). Dies ist der limitierende Schritt der  $\sigma^E$ -Kaskade (Chaba *et al.*, 2007). Das verbleibende RseA-Fragment wird durch einen weiteren proteolytischen Schnitt innerhalb des Transmembransegments von der innenmembranintegrierten Metalloprotease RseP prozessiert (Koide *et al.*, 2008). Die N-terminale Domäne von RseA mit dem gebundenen Sigmafaktor wird ins Cytoplasma entlassen, wo die cytoplasmatischen Hitzeschockproteasen ClpXP und Lon den Abbau von RseA abschließen. Nach der vollständigen Degradation von RseA wird RpoE freigesetzt und kann seine Zielpromotoren als alternativer Sigmafaktor regulieren (Hasenbein *et al.*, 2007). Zu den von RpoE regulierten Genen gehören unter anderen *degP*, *surA*, *fkpA*, *bepA*, *ptrA*, *skp* und *dsbC* (Rhodius *et al.*, 2006), sowie die Gene *rseA* und *rpoE* selbst, welche hochreguliert werden.

Die C-Termini der fehlgefalteten Proteine aktivieren die Protease DegP (siehe 1.4.3.1.1) via Oligomerisierung wodurch diese abgebaut werden.

Durch die zeitgleiche Expression von Chaperonen, Prolinomerasen, Oxidoreduktasen und Proteasen werden die fehlgefalteten Proteine repariert oder degradiert und dadurch eine Herstellung des Ausgangszustandes der Zelle angestrebt.

### 1.3.2 Cpx-System

Das Zweikomponentensystem Cpx (Abbildung 1.3) besteht aus der innenmembran-integralen Histidinkinase CpxA und dem Transkriptionsregulator CpxR. Die Cpx-Transkriptionsregulation wird durch eine Vielzahl von Stresssignalen im Periplasma von *E. coli* aktiviert und ist dabei sowohl positiven als auch negativen Autofeedback-Mechanismen unterworfen (Raivio *et al.*, 1999). Es wird neben allgemeinen Defekten der Zellhülle (Danese und Silhavy, 1998), durch die NlpE-vermittelte Adhäsion an hydrophobe Oberflächen bei der Biofilmbildung (Jones *et al.*, 1997) oder auch durch die Überexpression von Pilus-Untereinheiten wie PapE aktiviert (Otto und Silhavy, 2002). Das dritte Mitglied des Cpx-Systems ist das periplasmatische CpxP. Unter nicht-induzierenden Bedingungen interagiert CpxP mit CpxA auf der periplasmatischen Seite und hemmt dieses dadurch.



**Abbildung 1.3: Das Zweikomponentensystem Cpx in *E. coli***

Unter stressfreien Bedingungen liegt das Cpx-System inaktiv vor. Freies CpxP inhibiert die Sensor-kinase CpxA und der Antwortregulator CpxR nimmt eine inaktive Konformation ein. Unter Proteinfaltungstress binden fehlgefaltete Proteine an CpxP und aktiviertes DegP degradiert den Komplex aus Substrat und CpxP. Freies CpxA aktiviert CpxR über Autophosphorylierung, wodurch CpxR als Transkriptionsfaktor fungieren kann (Merdanovic *et al.*, 2011).

Unter Proteinfaltungsstressbedingungen, wie zum Beispiel der Überproduktion von Proteinen, welche die Tendenz zur Aggregation haben, wird das Cpx-System aktiviert. CpxP bindet an fehlgefaltete Proteine im Periplasma und titriert auf diese Weise von der periplasmatischen Sensor kinase von CpxA weg. Die Signaltransduktionskaskade wird durch eine Konformationsänderung des freien CpxA initiiert, die zur Autophosphorylierung eines konservierten Histidin-Restes führt. Anschließend phosphoryliert CpxA einen Aspartat-Rest des cytoplasmatischen CpxR, wodurch dieses als Transkriptionsfaktor fungieren kann. Etwa 50 transkriptionelle Einheiten scheinen direkt oder indirekt durch CpxR beeinflusst zu werden (Bury-Moné *et al.*, 2009; Price und Raivio, 2009). Zu den hochregulierten Genen des Cpx-Systems gehören u. a. *degP*, *dsbA*, *ppiD*, *ppiA*, *skp* und *spy* (Price und Raivio, 2009; Raivio und Silhavy, 2001). Zusätzlich interagiert phosphoryliertes CpxR mit einem Promoter des *rpoE/rseABC*-Operons wodurch Cpx den  $\sigma^E$ -abhängigen Signalweg negativ regulieren könnte (Price und Raivio, 2009).

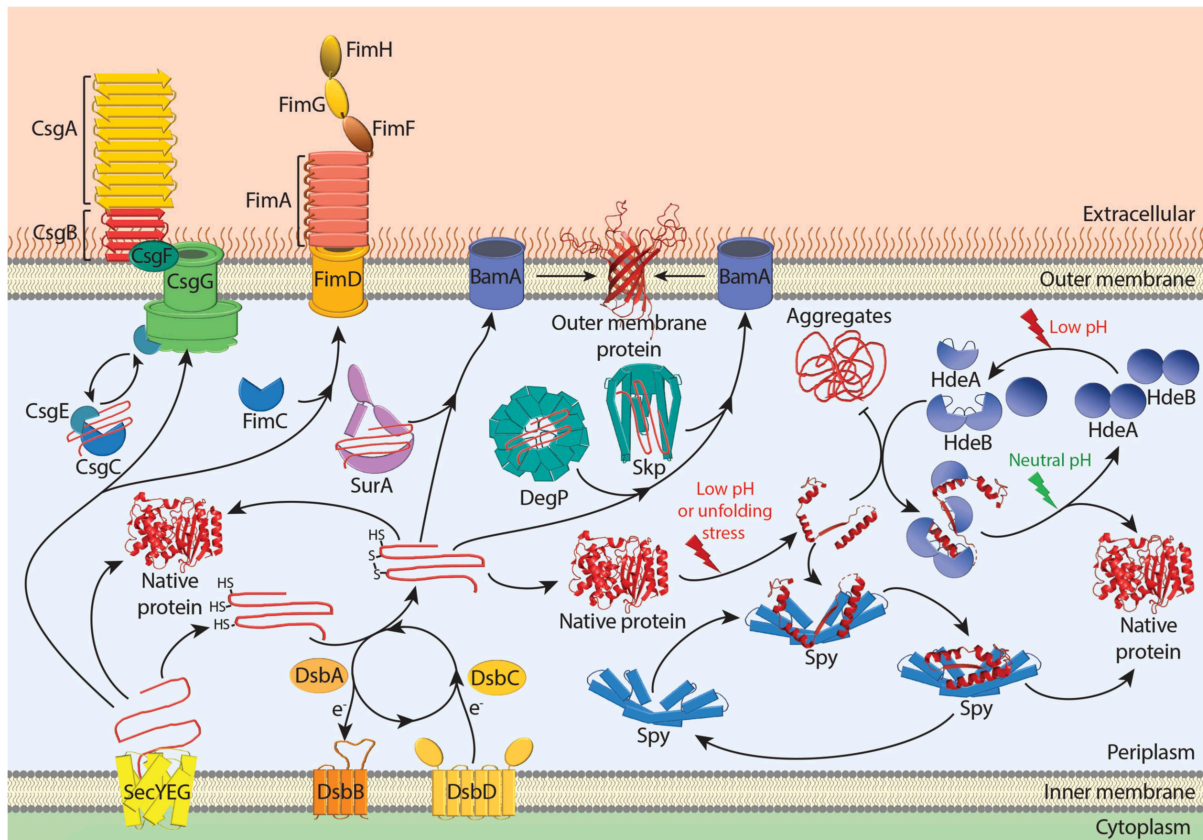
Die an CpxP gebundenen fehlgefalteten Proteine werden als Komplex von DegP degradiert (Isaac *et al.*, 2005).

Nachdem fehlgefaltete Proteine repariert oder degradiert wurden, assoziiert freies CpxP wieder mit CpxA. Dadurch wird CpxA als Phosphatase aktiv, dephosphoryliert CpxR und beendet dadurch die Cpx-Antwort. Pro Zelle liegen nur etwa 40 Moleküle CpxP vor (Surmann *et al.*, 2016).

## 1.4 Faltungsfaktoren im Periplasma

Der komplexe Mechanismus der Proteinfaltung beinhaltet langsame und schnelle Schritte. Bei der Proteinfaltung handelt es sich um spontane Prozesse, wie hydrophobe Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrücken und kovalente Interaktionen, welche die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins bedingen. Die Formation sekundärer Strukturelemente ( $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter) und ihre nichtkovalenten Interaktionen sind schnelle Schritte der Proteinfaltung. Langsame Schritte sind die kovalenten Modifikationen wie zum Beispiel die Disulfidbrückenbindung oder die Prolinisomerisierung, da chemische Reaktionen involviert sind. Aufgrund ihrer langen Reaktionszeit sind dies die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte des Prozesses und werden durch spezielle Enzyme katalysiert (siehe 1.4.2). Damit im Periplasma trotz der hohen Proteinkonzentration von 150 mg/ml (Weski, 2010) die Proteinfaltung geordnet ablaufen kann, interagieren die Polypeptide mit

speziellen Faltungsfaktoren (Abbildung 1.4). Molekulare Chaperone (siehe 1.4.1) verhindern die Aggregation fehlgefalteter Polypeptide und unterstützen auf diese Weise die Proteinfaltung, indem sie zum Beispiel die Substrate der Faltungskatalysatoren in Lösung halten. Der vorzeitige Abbau des ungefalteten Proteins durch Proteasen (siehe 1.4.3) wird dadurch ebenfalls verhindert.



**Abbildung 1.4: Überblick einiger Chaperone und Faltungsfaktoren der Proteinfaltung im Periplasma von *E. coli***

Nach der Translokation von ungefalteten periplasmatischen oder Außenmembranproteinen (OMP) durch das SecYEG-System werden die Polypeptide durch eine Vielzahl an Chaperonen und Faltungsfaktoren in ihrer korrekten Faltung unterstützt, vor Degradation geschützt und im Fall von OMP zum Bestimmungsort, der Außenmembran, geleitet. Dort werden sie über das Bam-System in die äußere Membran integriert (Stull *et al.*, 2018).

### 1.4.1 Molekulare Chaperone

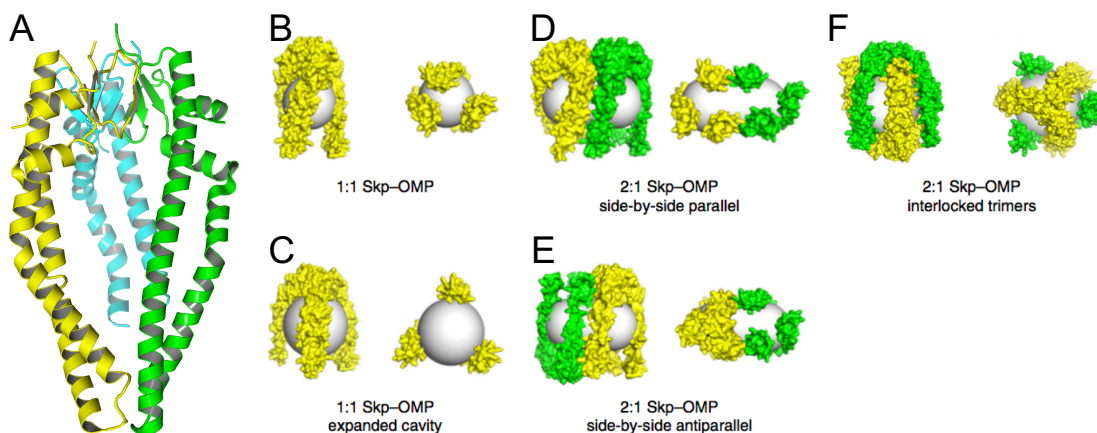
Molekulare Chaperone binden selektiv Polypeptide die in ihrer Konformation vom nativen Zustand abweichen. Dies ist der Fall, wenn sie fehlgefaltet vorliegen, oder oligomere Komplexe nicht oder unzureichend gebildet sind. Unterschieden werden die Substrate von gefalteten Proteinen, indem hydrophobe Eigenschaften auf der Oberfläche exponiert werden. Im Gegensatz zum Cytoplasma, in welchem die



Chaperonsysteme wie GroEL/ES und Dank/DnaJ sowohl identifiziert als auch die Mechanismen verstanden sind (Fink, 1999; Mayer, 2010), ist das Verständnis der periplasmatischen Chaperone weiterhin unvollständig.

#### 1.4.1.1 Skp

Das kleine periplasmatische Protein Skp (Seventeen Kilodalton Protein, 17,7 kDa) besteht aus 141 Aminosäuren und bildet Homotrimere. Jeweils drei  $\beta$ -Stränge der Untereinheiten bilden das zentrale  $\beta$ -Fass der trimeren Struktur (Walton und Sousa, 2004). Das  $\beta$ -Fass formt zusammen mit den C-terminalen  $\alpha$ -Helices der drei Monomere einen zentralen Hohlraum (Abbildung 1.5 (A)). Über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen werden Substrate darin gebunden (Qu *et al.*, 2007). Der zentrale Hohlraum von Skp kann schätzungsweise Proteine von bis zu etwa 25 kDa aufnehmen. Trotzdem ist Skp in der Lage mit ungefalteten OMP zu interagieren, die deutlich größer sind (Abbildung 1.5 (B-F)).



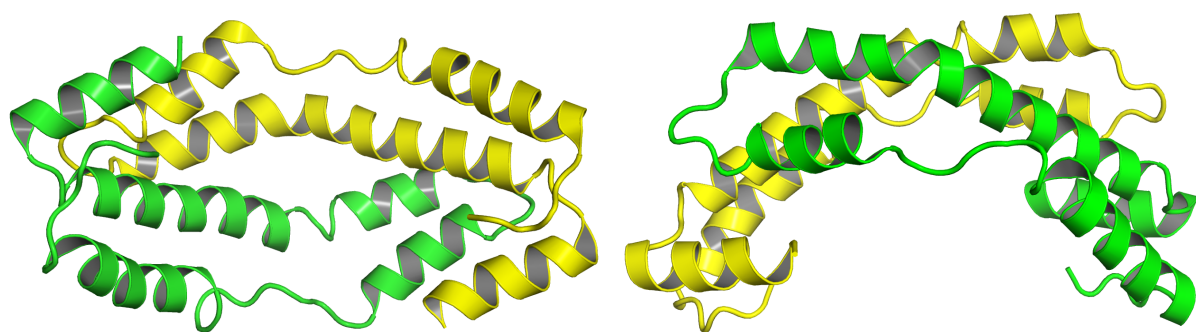
**Abbildung 1.5: Die dreidimensionale Struktur von Skp und mögliche Formen der Skp-OMP-Komplexe**

(A) Die Kristallstruktur des trimeren Skp von *Escherichia coli* (Protein Data Bank (PDB) ID 1SG2, modifiziert nach (Merdanovic *et al.*, 2011), *supplemental material*). (B-F) Seitenansicht (links) und Ansicht von unten (rechts) der Oberflächendarstellungen der Skp-OMP-Komplexe. Die Modelle von Skp basieren auf der publizierten Kristallstruktur (PDB 1U2M (Walton und Sousa, 2004)) mit fehlenden Aminosäuren die durch molekularen Ersatz moduliert wurden. In gelb oder grün ist jeweils ein trimeres Skp dargestellt. (B) Skp gebunden an ein achtsträngiges OMP repräsentiert durch eine graue Sphäre mit einem Radius von 20 Å. (C) Skp mit einer vergrößerten zentralen Bindehöhle, das ein 16-strängiges OMP in Form einer grauen Sphäre mit einem Radius von 25 Å umgibt. (D,E) 2:1 Skp-OMP-Strukturen die parallel (D), oder antiparallel (E) nebeneinander arrangiert sind. Das 16-strängige OMP wird durch eine graue Kapsel mit einer Zylinderhöhe von 37 Å und einem Halbkreisdurchmesser von 20 Å dargestellt. (F) Skp-OMP-Komplex in einer verschachtelten Architektur. Das 16-strängige OMP wird durch eine 25 Å große graue Sphäre repräsentiert (Schiffrin *et al.*, 2016).

Es wurde gezeigt, dass anscheinend nur die  $\beta$ -Fässer in die Bindehöhle von Skp aufgenommen werden. Bei größeren Substraten binden mehrere Skp-Chaperone an diese und unterdrücken auf diese Weise die Aggregation (Schiffrin *et al.*, 2016). Skp hat eine breite Substratspezifität (Jarchow *et al.*, 2008) und schützt OMP vor Fehlfaltung und Aggregation während ihres Transits zwischen der inneren und äußeren Membran (Korndörfer *et al.*, 2004; Walton *et al.*, 2009; Walton und Sousa, 2004). Es bindet an OmpA, OmpC, OmpF und LamB und stimuliert die Faltung in Anwesenheit negativ geladener Phospholipide (Chen und Henning, 1996; Patel *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2009). Skp ist in die Weitergabe der Substrate an den BAM-Komplex involviert (Abbildung 1.4), der hilft die Proteine zu falten und in die äußere Membran zu integrieren (Stull *et al.*, 2018).

#### 1.4.1.2 Spy

Ein weiteres kleines periplasmatisches Chaperon, das die Proteinaggregation senkt und die Rückfaltung fehlgefalteter Proteine unterstützt ist Spy (*Speroplast Protein Y*, Abbildung 1.4) (Quan *et al.*, 2011). Das 18,1 kDa kleine Protein besteht im nativen Zustand aus 138 Aminosäuren. Spy ist hauptsächlich helikaler Struktur und bildet Homodimere aus. Die Kristallstruktur von Spy (Kwon *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2011) zeigt die aktive Form als dünne, wiegenförmige Struktur mit großer hydrophober Oberfläche in der Mitte der „Wiege“ und basischen Aminosäuren an den Rändern (Abbildung 1.6).



**Abbildung 1.6: Kristallstruktur des periplasmatischen Chaperons Spy**

Kristallstruktur von Spy (PDB 3OEO) aus *Escherichia coli*. Die einzelnen Monomere sind in gelb und grün dargestellt. Die Struktur auf der rechten Seite ist um 90° rotiert und zeigt die wiegenförmige Struktur ((Merdanovic *et al.*, 2011) *supplemental material*).

Durch die strukturelle Flexibilität könnte die Interaktion mit einer Vielzahl an ungefalteten Polypeptiden gewährleistet werden (Quan *et al.*, 2011). Spy bindet

seine Substrate durch komplementäre Ladungsinteraktionen. Die positiv geladene Bindestelle interagiert mit negativ geladenen Substraten. Dieser Komplex wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Mitte der Wiegenstruktur von Spy und den ungefalteten Substraten stabilisiert (Koldewey *et al.*, 2016). Während Spy unter stressfreien Bedingungen normalerweise nicht exprimiert wird, wird es massiv überproduziert, wenn die Cpx-, Bae- oder Rcs-Signalwege durch verschiedene Arten an periplasmatischem Stress induziert werden (Bury-Moné *et al.*, 2009). Während Stressbedingungen durch Agenzien wie Ethanol, Butanol oder Tannine (pflanzliche Gerbstoffe) besteht das periplasmatische Proteom sogar zu einem hohen Prozentsatz aus dem Protein Spy (Srivastava *et al.*, 2014; Zoetendal *et al.*, 2008).

## 1.4.2 Faltungskatalysatoren

Aufgrund ihrer langen Reaktionszeiten sind die kovalenten Modifikationen, wie Prolinisomerisierung oder Disulfidbrückenbildung, während der Proteinfaltung die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte des Prozesses. Aus diesem Grund werden solche Modifikationen in der Zelle durch spezielle Enzyme katalysiert.

### 1.4.2.1 Prolinisomerasen

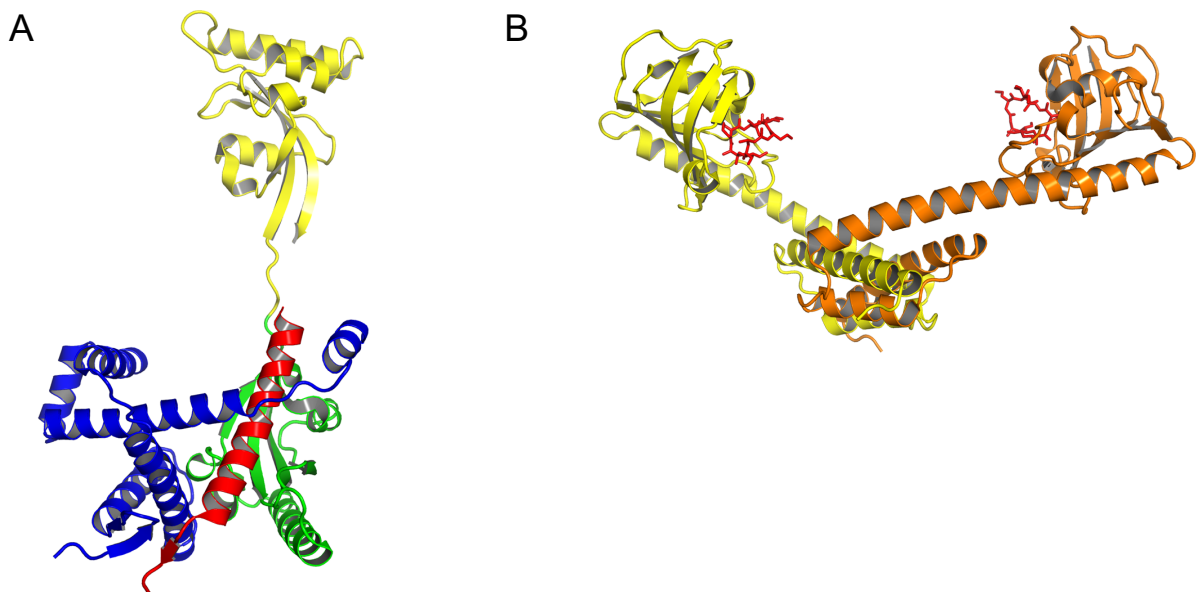
Die *cis-trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen ist einer der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte bei der Proteinfaltung. Für die korrekte Faltung bestimmter Proteine ist die *cis-trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen allerdings essentiell (Göthel und Marahiel, 1999). Beide Konformere in Peptidyl-Prolyl-Bindungen sind von vergleichbarer thermodynamischer Stabilität (Stein, 1993). Um einen vorzeitigen Abbau unvollständig gefalteter Proteine zu verhindern, wird der Prozess der *cis-trans*-Isomerisierung von spezifischen Isomerasen katalysiert.

Die ubiquitären Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPlasen) werden anhand ihrer spezifischen Inhibitoren in drei Familien unterteilt. Die Cyclophiline werden durch Cyclosporin A und die FK506-bindenden Proteine (FKBP) durch FK506 inhibiert. Dabei handelt es sich um Immunsuppressiva die bei der Organtransplantation eingesetzt werden. PPlasen, die eine ausgeprägte Sequenzhomologie zu PpiC aus *E. coli* aufweisen, sowie weder durch Cyclosporin A noch durch FK506 gehemmt werden, werden der Familie der Parvuline zugeordnet (Rahfeld *et al.*, 1994). PpiA gehört beispielsweise zu den Cyclophilinen, FkpA zur FKBP-Familie, den Parvulinen

sind PpiD und SurA zuzuordnen. Somit sind im Periplasma von *E. coli* Vertreter aller drei Klassen zu finden.

#### 1.4.2.1.1 SurA

Das Parvulin SurA besteht aus 408 Aminosäuren und kann in vier Elemente unterteilt werden. Es besteht aus einer N-terminalen, zwei PPlase- und einer C-terminalen Domäne (Abbildung 1.7). Funktionelle Analysen zeigten jedoch, dass nur die C-terminale PPlase-Domäne (P2-Domäne) katalytisch aktiv ist, während die N-terminale PPlase-Domäne (P1) inaktiv ist (Behrens *et al.*, 2001). Die P1-Domäne bildet zusammen mit der N- und C-terminalen Domäne eine zentrale Einheit des Proteins, während die P2-Domäne flexibel mit dieser Einheit verbunden ist. Ein Teil der N-terminalen Domäne bildet eine ausgeprägte Tasche, die eine mögliche Bindungsstelle für ungefaltete Polypeptidketten darstellen könnte (Bitto und McKay, 2002).



**Abbildung 1.7: Kristallstrukturen der Prolinisoimerasen SurA und FkpA**

(A) Kristallstruktur von SurA aus *Escherichia coli* (PDB 1MFY). Die N-terminale Domäne ist in blau dargestellt, gefolgt von den beiden PPlase-Domänen. Die P1-Domäne (grün) ist inaktiv, während die räumlich getrennte P2-Domäne (gelb) aktiv ist. Die C-terminale Domäne ist in rot dargestellt. (B) Kristallstruktur von FkpA aus *E. coli* im Komplex mit FK506 (PDB 1Q6I). FkpA bildet ein v-förmiges Dimer. Die Monomere sind in gelb und orange dargestellt. Die letzten 21 Aminosäuren von FkpA wurden entfernt. Die Dimerisierung erfolgt N-terminal, während am C-Terminus die PPlase-Domänen lokalisiert sind. In rot sind gebundene FK506-Moleküle dargestellt ((Merdanovic *et al.*, 2011) *supplemental material*).

Ursprünglich wurde SurA als essentieller Faktor für das Überleben in der stationären Phase von *E. coli* identifiziert (Tormo *et al.*, 1990). Später wurde aufgezeigt, dass die

primäre Funktion von SurA in der Faltung und dem Transport von OMP durch das Periplasma liegt (Lazar und Kolter, 1996; Rouvière und Gross, 1996). Im Anschluss daran wurde SurA als Schlüsselchaperon identifiziert, das OMP dem BAM-Komplex zur Integration in die äußere Membran zuführt (Abbildung 1.4) (Sklar *et al.*, 2007). Da die beiden PPlase-Domänen *in vitro* nur eine geringe PPlase-Aktivität zeigen wird vermutet, dass sie unter Umständen eine Rolle bei der Regulation der Chaperon-Domäne spielen (Ricci *et al.*, 2013; Soltes *et al.*, 2016). Entgegen vorheriger Annahmen zeigt eine aktuelle Untersuchung von Li und Kollegen, dass die Rolle von Skp (siehe 1.4.1.1) nicht redundant mit der Rolle von SurA ist, da sie mit unterschiedlichen Konformationen der OMP und mit unterschiedlicher Stöchiometrie daran binden (Li *et al.*, 2018). Zu den Substraten von SurA zählen die Außenmembranproteine OmpA, OmpF, OmpC, LamB (Lazar und Kolter, 1996; Rouvière und Gross, 1996), sowie LptD und FhuA (Vertommen *et al.*, 2009). SurA zeigt eine hohe Affinität zu Peptiden mit Sequenzen, die reich an aromatischen Resten sind, wie dem Sequenzmotiv  $\Phi$ -Xxx- $\Phi$ . Dabei ist  $\Phi$  ein aromatischer Rest und X ein beliebiger Rest. Dieses Muster kommt häufig am C-Terminus von OMP vor (Bitto und McKay, 2003; Hennecke *et al.*, 2005).

#### 1.4.2.1.2 PpiD

PpiD (*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D*) ist ein weiteres Parvulin im Periplasma von *E. coli*, das durch ein N-terminales Transmembransegment in der inneren Membran verankert ist. Der große periplasmatische Teil besteht aus drei Domänen, nämlich einer Parvulin-Domäne, die von großen N- und C-terminalen Domänen flankiert wird. Die N-terminale Region teilt dabei Ähnlichkeiten mit der N-terminalen Region von SurA (siehe 1.4.2.1.1), welche einen Großteil des Chaperonmoduls von SurA umfasst (Dartigalongue und Raina, 1998; Matern *et al.*, 2010; Weininger *et al.*, 2010). Da die Parvulin-Domäne keine detektierbare PPlase-Aktivität zeigt (Weininger *et al.*, 2010), wird aufgrund von *in vitro* Aggregationstests mit hitze-denaturierter Citratsynthase eine Chaperonaktivität von PpiD postuliert (Matern *et al.*, 2010). Die Interaktion von PpiD mit dem SecYEG-Translokationssystem lässt vermuten, dass PpiD die initiale Faltung vieler neu exportierter, unstrukturierter Polypeptide übernimmt (Antonoaea *et al.*, 2008). Dabei scheint PpiD eine breitere Substratspezifität als SurA aufzuweisen, da PpiD in Modellpeptiden neben aromatischen Resten auch hydrophobe Aminosäuren binden kann (Stymest und Klappa, 2008). Untersuchungen aus dem Jahr 2014 zeigen, dass PpiD eine

zusätzliche und transiente Untereinheit des SecYEG-Translokons sein könnte, da PpiD vor dem lateralen Ausgang des SecY-Kanals lokalisiert ist, durch welchen transmembrale Domänen das Translokationssystem verlassen (Sachelaru *et al.*, 2014).

#### 1.4.2.1.3 FkpA

Das 28,9 kDa große Protein FkpA gehört zur FKBP-Familie, da es FK506 bindet (Ramm und Plückthun, 2001). FkpA bildet Homodimere aus (Arié *et al.*, 2001), wobei jedes Monomer aus 245 Aminosäuren besteht und sich in zwei Domänen unterteilen lässt (Abbildung 1.7). Bei der C-terminalen Domäne (Reste 115-145) handelt es sich um die PPlase-Domäne, während über die N-terminale Domäne (Reste 1-114) die beiden Untereinheiten des Dimers verbunden sind (Saul *et al.*, 2004). Die N-terminale Domäne besteht hauptsächlich aus drei Helices, die mit den drei Helices der N-terminalen Domäne der zweiten Untereinheit verflochten sind (Saul *et al.*, 2004). Zusätzlich zeigt FkpA Chaperoneigenschaften, die unabhängig von der PPlase-Aktivität sind, da die Aggregation eher in stöchiometrischen als katalytischen Mengen verhindert wird (Arié *et al.*, 2001; Ramm und Plückthun, 2000). Trotz Entfernen der FKBP-Domäne bleibt das Protein in dimerer Form und behält die Chaperonfunktion bei. Die Aggregation eines Modelproteins konnte von dieser gekürzten Version des Dimers *in vivo* und *in vitro* verhindert werden, wodurch die biologische Funktion von FkpA scheinbar zu einem Großteil von der Chaperoneigenschaft vermittelt wird (Saul *et al.*, 2004). Während FkpA anscheinend in der Biogenese von OMP bei 37 °C eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, steigt die Wichtigkeit mit der Wachstumstemperatur. Bei 44 °C ist die Funktion von FkpA für das Überleben von *E. coli* genauso wichtig wie SurA (Ge *et al.*, 2014a).

#### 1.4.2.2 Oxidoreduktasen, insbesondere DsbA

Die Einführung von Disulfidbrücken ist neben den Peptidyl-Prolyl-Bindungen eine weitere wichtige posttranslationale Modifikation im Faltungsweg von Proteinen, die durch Enzyme katalysiert werden muss. Durch die kovalente Bindung zwischen zwei Cystein-Resten wird die dreidimensionale Proteinstruktur stabilisiert und oftmals erst dadurch die vollständige Funktionalität des Proteins erreicht. Obwohl der Prozess unter bestimmten Voraussetzungen spontan ablaufen könnte, wird die Effizienz und die Geschwindigkeit durch Katalysatoren drastisch erhöht. Enthält ein Protein

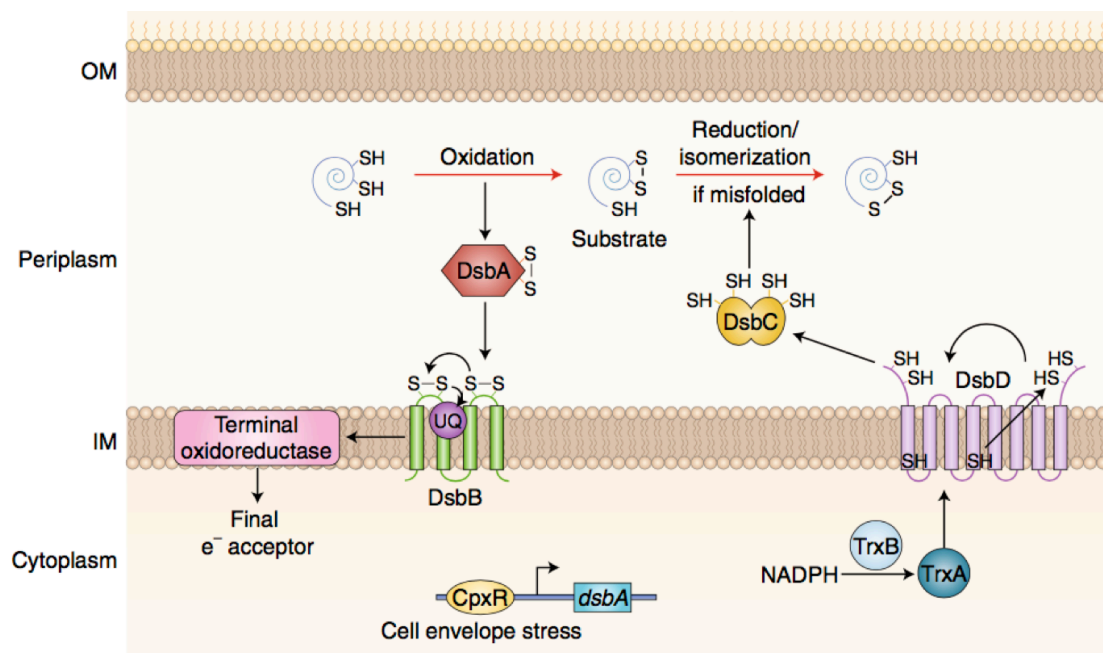
mehrere Disulfidbrückenbindungen, können Verbindungen zwischen den falschen Cystein-Resten gebildet werden. In solchen Fällen müssen Reduktase- und Oxidaseaktivitäten kombiniert werden, da zunächst falsche Verbindungen gelöst und im Anschluss in richtiger Anordnung neu arrangiert werden. Die Enzyme dafür sind in *E. coli* in Innenmembran und Periplasma lokalisiert, weswegen Substrate zunächst aus den reduzierenden Bedingungen des Cytoplasmas in die oxidierende Umgebung des Periplasmas transloziert werden müssen.

Die Proteine für die Disulfidbrücken sind in *E. coli* die gut untersuchten Dsb (*disulfide bond forming*)-Proteine. Dazu zählen DsbA, DsbB, DsbC, DsbD und DsbG.

Das 23,1 kDa große, monomere Protein DsbA ist im Periplasma lokalisiert und gehört zur Familie der Thioredoxine. Die Thioredoxine besitzen im aktiven Zentrum ein charakteristisches Cys-X-X-Cys-Motiv, welches DsbA mit Cys<sub>30</sub>-Pro<sub>31</sub>-His<sub>32</sub>-Cys<sub>33</sub> aufweist (Martin *et al.*, 1993). Dieses Thioredoxin-Motiv scheint ausschlaggebend für das hohe Redoxpotential von DsbA zu sein, da der Austausch der beiden Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen zu einer Änderung des Potentials führt (Mössner *et al.*, 1998). Unter den Disulfidoxidoreduktasen besitzt DsbA mit -120 mV das zweithöchste Redoxpotential (Grimshaw *et al.*, 2008; Wunderlich und Glockshuber, 1993). Die Substratbindung im nativen Protein findet vermutlich durch eine hydrophobe Stelle über den Cysteinen dieser Thioredoxindomäne statt (Guddat *et al.*, 1998). Die Kristallstruktur von DsbA zeigt unterhalb des aktiven Zentrums eine hydrophobe Spalte, die zur Bindung periplasmatischer Bereiche des interagierenden DsbB dienen könnte. Die Interaktion der beiden Proteine ist für den Elektronentransport unerlässlich (Inaba, 2009).

Unter normalen Bedingungen wird das *dsbA*-Gen konstitutiv exprimiert. Leidet die Zelle allerdings unter Stressbedingungen wird die Expression durch das Cpx-System (siehe 1.3.2) hochreguliert (Danese und Silhavy, 1997). Das Außenmembranprotein OmpA gehört u. a. zu den bereits identifizierten und gut untersuchten Substraten von DsbA. Da in der Zellhülle von *E. coli* allerdings über 300 Proteine mit mindestens zwei Cysteinen vorkommen, könnten diese ebenfalls potentielle Substrate von DsbA sein (Hiniker und Bardwell, 2004). DsbA oxidiert Substrate direkt cotranslational beim Austritt aus der SecYEG-Pore ins Periplasma durch die Bildung von Disulfidbrücken an benachbarten (konsekutiven) Cysteinen (Berkmen *et al.*, 2005; Kadokura und Beckwith, 2009). Dabei überträgt es die eigene Disulfidbrückenbindung auf das reduzierte Substrat, indem ein gemischt-kovalent gebundenes Intermediat zwischen Substrat und DsbA entsteht. Im Anschluss wird das reduzierte DsbA für eine erneute

Reaktion durch das membrangebundene DsbB reoxidiert (Bader *et al.*, 1999; Bardwell *et al.*, 1993). Erhöht sich allerdings das Redoxpotential des Periplasmas oder handelt es sich um nicht-konsequente Cysteine, kann es zu Fehlfaltungen des Substrats kommen (Berkmen *et al.*, 2005; Messens *et al.*, 2007). Ein wichtiges Qualitätskontrollelement während der oxidativen Proteinfaltung ist das Bemerkens und Korrigieren falsch gebildeter Disulfidbrückenbindungen. Diese Aufgabe, um die Degradation eines nicht-nativen Proteins durch Proteasen zu verhindern, übernimmt das dimere Protein DsbC (Bessette *et al.*, 1999; Depuydt *et al.*, 2011; Zapun *et al.*, 1995). Um falsche Disulfidbrückenbindungen anzugreifen, muss DsbC in reduzierter Form vorliegen. Diese Funktion wird durch das Innenmembranprotein DsbD gewährleistet, welches wiederum durch eine Thioredoxin-Reduktase und ein NADPH-abhängiges System reduziert wird (Kadokura *et al.*, 2003; Katzen und Beckwith, 2000). Abbildung 1.8 verdeutlicht diese Schritte.



**Abbildung 1.8: Disulfidbrückenbildung im Periplasma von *Escherichia coli***

DsbA oxidiert ein Substrat und wird dadurch reduziert. Um einen neuen Zyklus zu starten, wird DsbA von DsbB reoxidiert indem Elektronen auf Ubiquinone übertragen werden. Werden durch DsbA Disulfidbrücken an falscher Stelle eingefügt, reduziert DsbC die nicht-nativen Disulfidbrückenbindungen und ermöglicht die Formation nativer Bindungen. Die benötigten Elektronen werden über DsbD vom cytoplasmatischen Thioredoxin geliefert (Landeta *et al.*, 2018).



### 1.4.3 Proteasen

Trotz der Anwesenheit von Faltungshelfern, wie Chaperonen, Oxidoreduktasen und Prolinisomerasen, kann es zu Fehlfaltung und Aggregation von Polypeptiden in der *E. coli*-Zelle kommen. Durch die Degradation dieser nicht mehr benötigten Polypeptide durch Proteasen, wird eine wichtige Rolle in der Proteinhomöostase und Proteinqualitätskontrolle übernommen und so die Lebensfähigkeit der Zelle sichergestellt. Neben diesem vollständigen Abbau können Proteasen ihre Substrate auch nur teilweise prozessieren (limitierte Proteolyse), wodurch die Zielproteine aktiviert, inaktiviert, oder in ihrer Proteinfunktion verändert werden können (Turk, 2006). Proteasen sind Enzyme, welche die Hydrolyse der Peptidbindungen von Proteinen katalysieren und dadurch die Funktion von Proteinen irreversibel verändern (Overall und Blobel, 2007).

Proteasen werden derzeit anhand der funktionellen Gruppe im aktiven Zentrum, die für die katalytische Aktivität notwendig ist, in sieben Klassen unterteilt. Es handelt sich dabei um Serin-, Metallo-, Cystein-, Asparagin-, Aspartat-, Glutamat- und Threoninproteasen (Rawlings *et al.*, 2011). In der MEROPS-Datenbank erfolgt eine weitere Differenzierung aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten und Sequenzhomologien in Familien und Clans (Barrett *et al.*, 2001).

Das Periplasma von *E. coli* enthält 20 Proteasen aus drei verschiedenen Klassen. Neun Proteasen gehören zur Klasse der Serinproteasen (DegP, DegQ, Prc, YdgD, PBP4, PBP5, PBP6, PBP6B und PBP7), sechs werden der Klasse der Metalloproteasen zugeordnet (PtrA, BepA, MepA, IAP, YebA und YhjJ) und drei stammen aus der Klasse der Cysteinproteasen (NlpC, YafL und YdhO). Zwei potentielle Proteasen wurden noch nicht klassifiziert (YdcP und YhbU) (Kucz *et al.*, 2006).

#### 1.4.3.1 Serinproteasen

Mit mehr als einem Drittel aller bekannten Proteasen nimmt die Klasse der Serinproteasen den größten Anteil ein (Page und Di Cera, 2008). Auch im Periplasma sind neun von 20 Proteasen der Klasse der Serinproteasen zuzuordnen (Kucz *et al.*, 2006). Gemein ist allen Serinproteasen, dass sie einen nukleophilen Serinrest im katalytischen Zentrum aufzeigen, während sie sich in molekularen Strukturen und katalytischen Mechanismen unterscheiden. In den meisten Fällen wird die Aktivität durch eine katalytische Triade aus den drei Aminosäuren Serin,

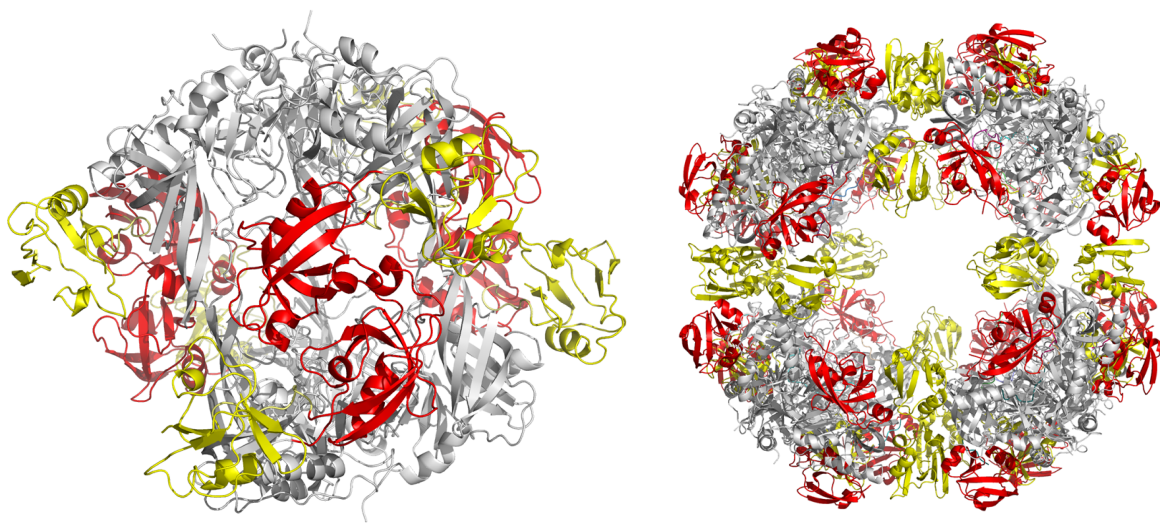
Aspartat und Histidin vermittelt, jedoch wurden auch Zweier- oder Dreierkombinationen anderer Aminosäuren mit Serin beschrieben (Hedstrom, 2002).

#### 1.4.3.1.1 DegP

Das periplasmatische Protein DegP ist ein multifunktionales Protein, welches als Faktor der Proteinqualitätskontrolle die Zelle vor Proteinfaltungstress bewahrt. Dazu nutzt es sowohl seine Chaperon- als auch Proteaseaktivitäten (Spiess *et al.*, 1999). DegP wird als 51 kDa großes Vorläuferprotein synthetisiert, das native Protein im Periplasma weist eine Größe von 49,4 kDa auf. Von beiden oben beschriebenen stress-induzierten Signaltransduktionswegen  $\sigma^E$  (siehe 1.3.1) und Cpx (siehe 1.3.2) wird das Hitzeschockprotein DegP hochreguliert. Es gehört zur Familie der HtrA (*high temperature requirement A*)-Proteasen und teilt die typische Architektur dieser Proteingruppe. HtrAs weisen neben einer Protease-Domäne mit Chymotrypsin-ähnlicher Struktur eine oder mehrere PDZ-Domänen auf. Die PDZ-Domänen dienen dabei der Protein-Protein-Interaktion. Es werden gewöhnlich drei bis vier Aminosäuren der Substrate von der PDZ-Domäne gebunden. Allerdings ist durch die Anlagerung von allosterischen Aktivatoren an die PDZ-Domänen auch eine Verstärkung der Proteaseaktivität möglich (Wilken *et al.*, 2004). DegP besitzt zwei C-terminale PDZ-Domänen und eine konservierte N-terminale Protease-Domäne pro Monomer. Die katalytische Triade von DegP besteht aus Histidin 105, Aspartat 135 und Serin 210. Fehlgefaltete, periplasmatische Proteine wie MBP, MalS, aber auch defekte OMP wie zum Beispiel LamB gehören zu den Substraten von DegP (Betton *et al.*, 1998; Misra *et al.*, 1991; Spiess *et al.*, 1999). DegP fungiert bei niedrigen Temperaturen als Chaperon, indem es an hydrophobe Oberflächen ungefalteter Substrate bindet. Die gebundenen Substrate werden dadurch vor dem Abbau geschützt und ihre Rückfaltung assistiert. Mit steigender Temperatur werden die fehlgefalteten Proteine durch die erhöhte Proteaseaktivität degradiert (Spiess *et al.*, 1999). Neuere Studien bestätigen die vorrangige Proteasefunktion von DegP wenn während eines Hitzeschocks faltungsdefekte OMP im Inneren des Enzyms eingekapselt sind (Ge *et al.*, 2014b).

DegP hat als Protease eine breite Substratspezifität, die sich allerdings exklusiv gegen ungefaltete, fehlgefaltete, oder unkorrekt gefaltete, überproduzierte rekombinante Proteine richtet (Clausen *et al.*, 2002). Diese ungefalteten Polypeptide werden von DegP über die PDZ-Domäne 1 erkannt, indem der C-Termini eines Substrats gefangen wird. Im Anschluss wird das Substrat von einem benachbarten

aktiven Zentrum geschnitten. Da sowohl die PDZ-Domänen als auch das aktive Zentrum ähnliche hydrophobe Sequenzen erkennen, werden die entlassenen Substrate nach dem ersten Schnitt meist von einer naheliegenden PDZ-Domäne erneut gefangen und einem weiteren Degradationszyklus unterzogen. Durch diesen Mechanismus wird sichergestellt, dass Intermediate nicht frühzeitig entlassen werden und zu Proteinaggregaten der Fragmente führen (Clausen *et al.*, 2011; Merdanovic *et al.*, 2011). DegP besitzt die Fähigkeit die Aktivität durch den konservierten Mechanismus der Aktivierung durch Oligomerisierung zu regulieren (Krojer *et al.*, 2010; Krojer *et al.*, 2008; Merdanovic *et al.*, 2010).



**Abbildung 1.9: Strukturen des Hexamers und 24mers von DegP**

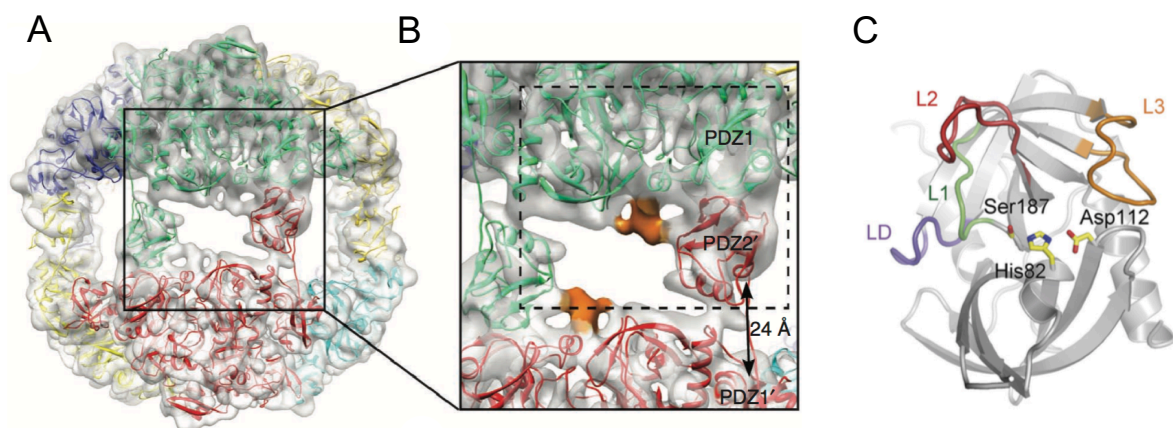
Die hexamere und 24mere Struktur von DegP aus *E. coli*. Die Proteasedomäne ist in grau, die PDZ-Domäne 1 in rot und die PDZ-Domäne 2 in gelb dargestellt. Die linke Struktur zeigt die geschlossene Konformation des Hexamers im Ruhezustand (PDB 1KY9). Die rechte Struktur bildet die aktive Form des 24mers von DegP ab (PDB 3CSO) (Merdanovic *et al.*, 2011).

Im Ruhezustand besteht DegP aus einem hexameren Komplex, der sich aus zwei trimeren Ringen zusammensetzt. Die beiden Trimere bilden dabei jeweils eine trichterähnliche Struktur, aus welcher die PDZ-Domänen seitlich herausragen. Der Ruhezustand wird durch strukturell ungeordnete aktive Zentren, zum Beispiel die katalytische Triade oder die Oxianionhöhe charakterisiert (Krojer *et al.*, 2002). Während der Aktivierung bilden sich aus den Hexameren höhere Oligomere, die proteolytisch aktiv sind und in ihren inneren Hohlräumen Substrate unterbringen können. Die aktive Form, das 24mer, hat eine molekulare Masse von 1,13 MDa und der innere Hohlraum hat einen Durchmesser von 110 Å. Dies ist groß genug, um OMP wie OmpA, OmpF, OmpC und LamB im Inneren abzubauen oder das korrekt

gefaltete Protein als Haltechaperon durch das Periplasma zur Außenmembran zu transportieren (Krojer *et al.*, 2008). 2016 wurde von Braselmann und Kollegen herausgefunden, dass die Chaperonfunktion von DegP *in vivo* die toxischen Auswirkungen der Intermediate der Pertactinproduktion unterdrückt und somit das Überleben der Zelle sichert (Braselmann *et al.*, 2016).

#### 1.4.3.1.2 DegQ

DegQ ist eine weitere periplasmatische Serinprotease in *E. coli* (Bass *et al.*, 1996; Waller und Sauer, 1996), die durch eine 58%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz als Homolog zu DegP beschrieben wurde. Wie bei DegP ist jedes Monomer von DegQ aus einer N-terminalen Proteasedomäne und zwei C-terminalen PDZ-Domänen aufgebaut. Beide Proteasen haben eine ähnliche Substratspezifität und schneiden fehlgefaltete Proteinsubstrate (Kolmar *et al.*, 1996). Die Proteasedomäne und vor allem der LA-loop weisen dabei eine geringere Sequenzhomologie auf. Im Gegensatz zu DegP hat DegQ keinen durch Hitzestress induzierten Promotor. DegQ weist bei hitzeinduziertem Stress keinen eigenen Ausfallphänotyp auf, kann allerdings bei Überproduktion den temperatursensitiven letalen Phänotyp von *degP*-Nullmutanten kompensieren (Waller und Sauer, 1996).



**Abbildung 1.10: Struktur vom 24mer von DegQ und die katalytische Triade**

(A) Das aktive 24mer von DegQ als Cryo-EM-Aufnahme. Jede trimere Untereinheit ist farblich anders dargestellt. (B) Vergrößerung einer Kontaktregion zwischen zwei Trimeren. Die PDZ-Domäne 1 interagiert dabei mit der PDZ-Domäne 2 eines benachbarten Trimers, wodurch eine Käfigstruktur bedingt wird (Malet *et al.*, 2012). (C) Protease-Domäne eines um die PDZ-Domäne 2 gekürzten Monomers DegQ. Hervorgehoben ist die katalytische Triade His82, Asp112 und Ser187 (Sawa *et al.*, 2011).

Im Ruhezustand scheint DegQ im hexameren Zustand vorzuliegen und geht bei Aktivierung durch Oligomerisierung zu 12- oder 24meren (Abbildung 1.10 (A,B)) in den aktiven Zustand über. Die Oligomerisierung erfolgt dabei durch die Bindung von OMP an die PDZ-Domäne 1 (Sawa *et al.*, 2011). Die katalytische Triade von DegQ besteht aus Histidin 82, Aspartat 112 und Serin 187 (Abbildung 1.10 (C)).

Als Dodecamer (12mer) bildet DegQ eine Käfigstruktur aus und umschließt auf diese Weise Substrate. Die Substrate können ihre Konformation in die native Ausgangslage rückfalten, oder werden degradiert. Durch die Bindung der Substrate mit der PDZ-Domäne 1, spielt diese auch für die Chaperonfunktion eine entscheidende Rolle (Malet *et al.*, 2012).

#### 1.4.3.1.3 Prc

Die Serinprotease Prc (*processing defective*) oder auch Tsp (*tail-specific protease*) ist eine große Endoprotease (660 Aminosäuren) mit einem molekularen Gewicht von 76,7 kDa. Nach der MEROPS-Nomenklatur wird sie dem SK-Clan zugeordnet und ist ein Mitglied der S41-Familie, zu der auch die Tricorn-Protease aus *Thermoplasma acidophilum* gehört (Rawlings *et al.*, 2010). Prc liegt im Periplasma von *E. coli* als Monomer vor, weist keine Sequenzhomologie zu gut charakterisierten Proteasen auf und wird auch nicht von den typischen *small-molecule* Proteaseinhibitoren gehemmt (Silber *et al.*, 1992). Es besteht aus einer C-terminalen Protease-Domäne und einer vorgelagerten N-terminalen PDZ-Domäne, die die Substratspezifität zu vermitteln scheint (Weski *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu DegP (siehe 1.4.3.1.1) und DegQ (siehe 1.4.3.1.2) besteht das aktive Zentrum von Prc aus einer katalytischen Dyade aus Serin 430 und Lysin 455 (Keiler und Sauer, 1995). Die Aminosäuren Gly375, Gly376, Glu433 und Thr452 sind für die Aufrechterhaltung der Struktur von Prc wichtig (Keiler und Sauer, 1995).

Prc erkennt ungefaltete oder unvollständig synthetisierte Polypeptide mit hydrophoben C-Termini als Substrate (Keiler und Sauer, 1995; Keiler und Sauer, 1996; Silber *et al.*, 1992) und bindet apolare Peptide mit niedriger mikromolaren Affinität an die PDZ-Domäne (Beebe *et al.*, 2000). Durch die Bindung eines unpolaren C-Terminus, der ein L(I)RV-Motiv aufweist und länger als fünf Aminosäuren ist, wird Prc sequenzspezifisch aktiviert (Weski *et al.*, 2012). Zu den Substraten gehören zum Beispiel SecM (Nakatogawa und Ito, 2001), das Lipoprotein Nlpl (Tadokoro *et al.*, 2004) und das Penicillin-Bindeprotein FtsI (Nagasawa *et al.*, 1989). Neuere Studien ergaben, dass Prc anscheinend mit Nlpl komplexiert (ein

Nlpl-Homodimer bindet zwei Prc-Moleküle) um die Degradation des Substrats MepS zu erleichtern. Prc formt dabei eine monomere schüsselgeformte Struktur mit einer deckelartigen PDZ-Domäne. Diese werden durch ein substraterkennendes Gelenk verbunden, welches den gebundenen C-Terminus des Substrats erkennt (Su *et al.*, 2017).

Prc schneidet beim Abbau von Substraten sequenzspezifisch, wodurch Abbau-sequenzen unterschiedlicher Länge entstehen (Keiler *et al.*, 1995). Häufig (14 von 20 Schnittstellen) schneidet Prc hinter den Aminosäuren Alanin, Serin oder Valin. Seltener (sechs von 20 Schnittstellen) wird hinter Isoleucin, Leucin, Arginin und Lysin geschnitten. Zudem ist es möglich, dass eine weitere Ligandenbindestelle neben der PDZ- und der Proteasedomäne existiert, die Substratbindung und Verarbeitung des Substrats am aktiven Zentrum positiv beeinflusst (Weski *et al.*, 2012).

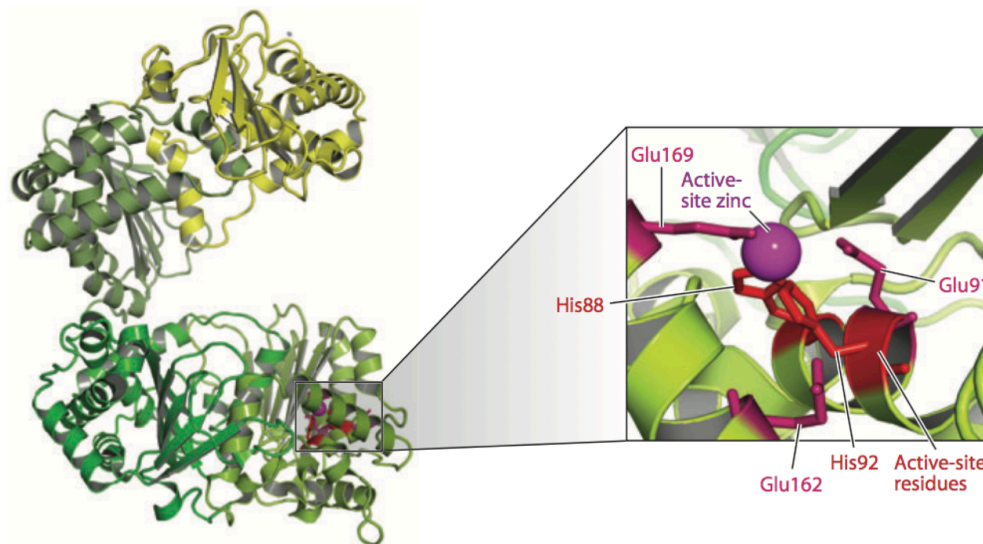
### 1.4.3.2 Metalloproteasen

Im Gegensatz zu den Serinproteasen enthält das aktive Zentrum von Metalloproteasen für gewöhnlich ein divalentes Metallion. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um ein Zinkion, welches im nativen Zustand tetraedrisch koordiniert vorliegt. Das Metallion bildet dabei einen Komplex mit drei Aminosäureresten (Histidin, Glutamat, Aspartat oder Lysin) des Enzyms und einem Wassermolekül.

#### 1.4.3.2.1 PtrA

Das periplasmatische PtrA (*Pitrilysin* oder Protease 3) ist mit knapp 107,7 kDa und 939 Aminosäuren eine große Metalloprotease, deren Sequenz hochkonserviert ist. PtrA setzt sich aus vier Domänen ähnlicher Struktur zusammen, von welchen nur die erste Domäne die katalytische Struktur mit dem Zinkion aufweist (Merdanovic *et al.*, 2011). Die Kristallstruktur zeigt dabei eine typische  $\alpha/\beta$ -Struktur, wobei die Domänen einen zentralen Hohlraum zu umschließen scheinen (Abbildung 1.11). Das Zink-Bindemotiv der PtrA-Proteinfamilie M16 (HEXXH-Motiv) ist bei allen Metalloproteasen mit einem Zinkatom hochkonserviert (Rawlings und Barrett, 1995). Im Falle von PtrA liegt es allerdings in abgewandelter, invertierter Form vor (HXXEH). Für die Koordination des Zinkatoms sind die beiden Histidine an den Positionen 88 und 92 verantwortlich. Das Glutamat 169 ist ebenfalls an der Zinkbindung beteiligt und das Glutamat 91 ist in den katalytischen Mechanismus eingebunden. Die komplette Sequenz des aktiven Zentrums von PtrA lautet demnach HXXEHX<sub>n</sub>E (Becker und Roth, 1993).

PtrA degradiert fehlgefaltetes MalE31, eine fehlerhafte Faltungsmutante des Maltosebindende Proteins (Betton *et al.*, 1998), sowie  $\beta$ -Lactamase, die im Periplasma nicht in eine proteaseresistente Konformation faltet (Baneyx und Georgiou, 1991). Es wird eine überlappende Funktion von PtrA und DegP vermutet, da *ptrA degP* Doppelmutanten ein reduziertes Wachstum im Vergleich zu den Einzelmutanten aufweisen (Baneyx und Georgiou, 1991). Es wird daher vermutet, dass PtrA in die Proteinqualitätskontrolle involviert ist (Merdanovic *et al.*, 2011).



**Abbildung 1.11: Kristallstruktur der periplasmatischen Metalloprotease PtrA**

Kristallstruktur von PtrA aus *E. coli* (PDB 1Q2L). Die vier Domänen sind in unterschiedlichen Grüntönen dargestellt. In der N-terminalen Domäne befindet sich das aktive Zentrum: His88 und His92 sind in rot, Glu91, Glu162 und Glu169 in pink dargestellt. Das Zinkatom wird als Sphäre in magenta gezeigt (Merdanovic *et al.*, 2011).

#### 1.4.3.2.2 BepA

BepA (*Beta-barrel assembly-enhancing protease A*) ist eine periplasmatische Metalloprotease mit einer molekularen Masse von 53,9 kDa, die auch unter dem Synonym YfgC bekannt ist. BepA ist ein Homolog der M48-Familie und begünstigt die Umlagerung intramolekularer Disulfidbrückenbindungen von LptD, welches ein essentielles OMP ist, das in den Transport zur äußeren Membran und den Zusammenbau von Lipopolysacchariden involviert ist (Narita *et al.*, 2013). Des Weiteren postulieren Narita und Kollegen, dass BepA eine Proteaseaktivität aufweist, da es an der proteolytischen Qualitätskontrolle von LptD beteiligt ist und fehlgefaltetes LptD abbaut. Die Degradation von BamA, der zentralen OMP-Untereinheit des BAM-Komplexes wird ebenfalls begünstigt (Narita *et al.*, 2013). Neben der proteolytischen Funktion, durch die fehlgefaltete OMP eliminiert werden,

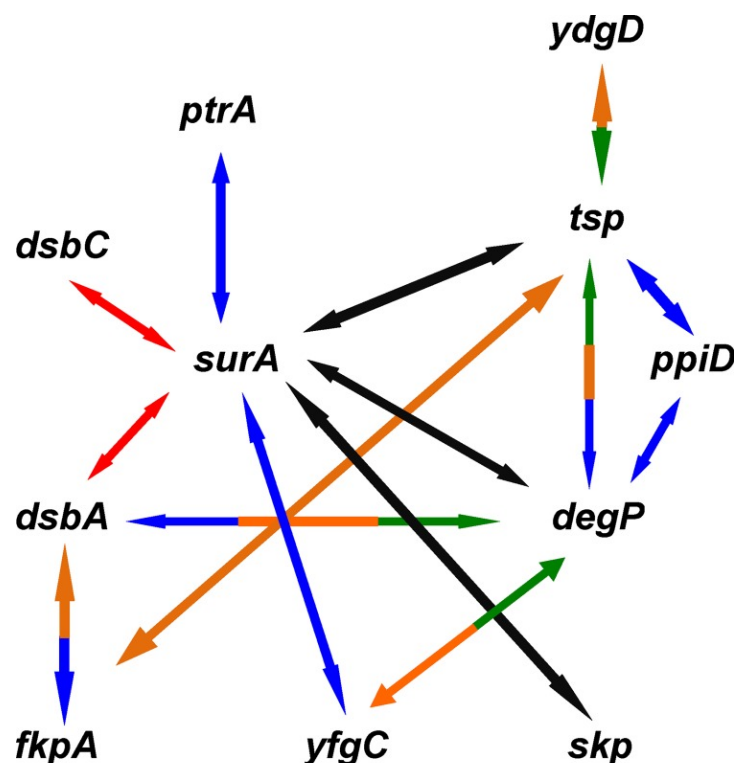
scheint BepA beim Zusammenbau von LptD eine Chaperonfunktion aufzuweisen und durch diese beiden Funktionen eine kritischen Rolle bei der Aufrechterhaltung der Qualität der äußeren Membran zu haben (Narita *et al.*, 2013; Soltes *et al.*, 2017). BepA besteht aus einer N-terminalen Proteasedomäne und einer C-terminalen *tetratricopeptide repeat* (TPR)-Domäne. Die TPR-Domäne setzt sich aus zwei Subdomänen zusammen, die durch vier TPR-Motive gebildet werden und spielt anscheinend für die Funktion von BepA eine entscheidende Rolle. Denn es wird vermutet, dass sie sowohl mit dem Substrat, als auch mit dem BAM-Komplex in Interaktion tritt (Daimon *et al.*, 2017).

## 1.5 Genetische Daten und Phänotypen von Doppelmutanten

Rizzitello *et al.* erlangten durch die Herstellung synthetisch letaler Phänotypen erste Erkenntnisse zur Organisation von periplasmatischen Faltungsfaktoren. Durch Deletionsstudien wurden letale Kombinationen für Nullmutationen gefunden. Die Paarungen von *surA* und *skp*, sowie *surA* und *degP* ergaben synthetisch letale Phänotypen, während die *skp degP*-Doppelmutante gänzlich unauffällig war. Daraus folgerten sie, dass SurA und DegP bzw. Skp redundante Faktoren seien, die in zwei unterschiedlichen Faltungswegen organisiert sein müssen (Rizzitello *et al.*, 2001). Im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation (Weski, 2010) wurden 84 Mutanten zur Charakterisierung möglicher Faltungswege der Proteinqualitätskontrolle konstruiert, bei denen jeweils zwei ausgewählte Faltungsfaktoren nicht exprimieren. Bei diesen Doppel-*Knockout*-Mutanten (Doppel-KO-Mutanten) wurde die Membranintegrität, sowie das Wachstum unter optimalen Bedingungen und verschiedenen Stressbedingungen untersucht. Es wurden 11 Stämme gefunden die synthetisch letale Phänotypen aufwiesen bzw. genetische Interaktionen, die Einfluss auf die Proteinqualitätskontrolle der Zellhülle besaßen. Diese wurden anhand von quantitativen *Real-Time*-PCR-Analysen (qRT-PCR-Analysen) und Untersuchungen zu metabolischen Prozessen genauer charakterisiert. Eine Bedeutung der genetischen Interaktionen für die Proteinqualitätskontrolle konnte bei den sieben Doppelmutanten *degP dsbA*, *degP tsp*, *surA dsbA*, *surA ptrA*, *surA yfgC*, *dsbA fkpA* und *tsp ydgD* belegt werden. Als Schlüsselemente, basierend auf deutlichen Faltungsdefekten, wurden dabei die Proteine DsbA, DegP, Tsp und SurA identifiziert.



Durch Western Blot-Analysen konnten mögliche funktionelle Redundanzen der verschiedenen Faltungsfaktoren auf Proteinebene bestätigt werden, da gemeinsame Substrate identifiziert wurden. Durch eine Expressionsanalyse auf RNA-Ebene wurde ausgeschlossen, ob die möglichen Effekte durch eine reduzierte Genexpression verursacht werden oder tatsächlich auf Faltungsdefekte im Periplasma hinweisen. Als potentielle Substrate wurden die Außenmembranproteine FhuA, OmpW und LamB untersucht. Es wurden sieben Doppel-KO-Stämme (*degP dsbA*, *degP tsp*, *degP yfgC*, *degP ppiD*, *surA dsbA*, *surA ptrA* und *surA yfgC*) gefunden, die anscheinend Probleme mit Außenmembranproteinen auf Proteinebene aufweisen.



**Abbildung 1.12: Übersicht über synthetische Phänotypen**

Die Pfeile zeigen die synthetischen negativen Phänotypen der Doppel-Knockout-Mutanten. Die Farben repräsentieren dabei die Wachstumsbedingungen: **schwarz**, Vollmedium; **rot**, erhöhte Temperatur (43 °C); **blau**, Hyperosmolarität in Kombination mit erhöhter Temperatur (42 °C); **grün**, SDS/EDTA und **orange**, Membrandefekte (Weski und Ehrmann, 2012).

Im Jahr 2012 postulierten Weski und Ehrmann durch die genetische Analyse von 15 Faltungsfaktoren und Proteasen der Zellhülle von *E. coli* die Existenz mehrerer paralleler Faltungswege in einem flexibel organisierten Netzwerk. Alle sieben getesteten Faltungsfaktoren (DsbA, DsbC, DegP, FkpA, PpiD, Skp und SurA) waren unter mindestens einer Wachstumsbedingung synthetisch letal wenn sie miteinander oder mit einer Protease kombiniert wurden. Bei einigen Kombinationen ließ die

Abgabe von  $\beta$ -Galaktosidase ins Medium eine fragile Zellhülle vermuten und die Induktion des Gens *spy* deutete auf eine Aktivierung der periplasmatischen Stressantwort hin. Die graphische Darstellung der negativen synthetischen Phänotypen zeigt, dass die kombinatorischen Effekte der einzelnen Mutationen stark von den jeweiligen Wachstumsbedingungen abhängen (Abbildung 1.12). Diese Ergebnisse ließen Weski und Ehrmann vermuten, dass unter den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen jeweils andere Faltungsfaktoren der Proteinqualitätskontrolle für die Rettung der Zelle zuständig sind (Weski und Ehrmann, 2012).

## 1.6 Zielsetzung

Fehl- oder ungefaltene Proteine können in der Zelle zu schwerwiegenden Folgen für den gesamten Organismus führen. So wird zum Beispiel die Aggregation von Proteinen mit Krankheiten wie Alzheimer und Mukoviszidose in Verbindung gebracht (Amaral, 2004; Dobson, 2003). Die Zellhülle des gramnegativen Bakteriums *E. coli* ist ein wichtiges experimentelles Modellsystem, um ein Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Proteinfaltung zu erlangen. *E. coli* hat ein kompartment-spezifisches System zur Proteinqualitätskontrolle entwickelt, mit dem es auf die Präsenz fehlgefalteter Proteine reagieren kann. Besonders die Zellhülle ist Umwelteinflüssen wie Detergenzien, erhöhter Temperatur und veränderter Osmolarität ausgesetzt, was zu Proteinfaltungstress führen kann. Ein gut funktionierendes Proteinqualitätskontrollsystem, bei dem fehlgefaltete Proteine durch Chaperone oder Proteasen repariert oder degradiert werden und dadurch die Menge an aggregationsanfälligen Proteinen reduziert wird, ist somit essentiell für das Überleben der Zelle. Um die Effizienz und Reaktionsfähigkeit dieses Systems zu erhöhen und die Stabilität zu gewährleisten, scheinen die Faktoren in einem flexiblen Netzwerk organisiert zu sein. Über potentielle Interaktionen der Faltungshelfer untereinander und zu den entsprechenden Substraten ist bisher wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die zuvor gesammelten ersten Hinweise auf ein potentielles Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli* weitergehend zu untersuchen. Dabei soll insbesondere versucht werden die Organisation des Netzwerks detaillierter aufzuklären, Interaktionen zu verifizieren und weitere Interaktionspartner zu identifizieren. Dafür soll zunächst in ausgewählten Deletionsstämmen jeweils ein *Knockout* durch eine extrachromosomale Über-

expression ausgeglichen werden. Die dabei hergestellten Proteine sollten im Anschluss gereinigt und in Bezug auf die gebundenen Substrate massenspektrometrisch analysiert werden. Um eine Proteolyse der Substrate zu verhindern, wurden bei den Proteasen enzymatisch inaktive Mutanten genutzt.

Im nächsten Schritt sollen sogenannte Degradationsassays etabliert werden. Hierfür sollen geeignete Proteasen aus dem Periplasma ausgewählt werden. Diese sollen ein *in vivo* Substrat proteolysieren und das daraus resultierende Degradationsmuster mittels massenspektrometrischer Analysen der Peptidfragmente untersucht werden. Im Weiteren sollen diese etablierten Assays genutzt werden, um die Kombination mit weiteren Faltungsfaktoren zu charakterisieren. Sollten die Faltungsfaktoren ebenfalls an das Substrat binden, sollte sich das Degradationsmuster ändern. Aus diesen Daten könnte das Verständnis des Netzwerks der Stressantwort erheblich erweitert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeines und Chemikalien

Zur Herstellung von Medien, Puffern und Lösungen wurde, soweit nicht anders vermerkt, hochreines Milli-Q®-Wasser (vollentsalztes Wasser mit nachgeschaltetem *water purification system* MilliQ Biocel, Merck, Darmstadt, Deutschland (DE)) verwendet, das im Rahmen dieser Arbeit als *Aqua destillata* (*A. dest.*) bezeichnet wird. Alle verwendeten Chemikalien für die Puffer und Lösungen besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad *pro analysi* und wurden, soweit nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Sigma-Aldrich (München, DE), Merck (Darmstadt, DE), Serva (Heidelberg, DE), Roth (Karlsruhe, DE) und Invitrogen (Karlsruhe, DE) bezogen.

**Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien**

Hersteller	Chemikalien
BD Otto Nordwald, Hamburg, DE	Bacto™ Agar, Bacto™ Hefeextrakt
Bernd Kraft, Duisburg, DE	37 % Salzsäure (HCl)
Biozym, Hessisch Oldendorf, DE	Agarose
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30), Ampicillin Natriumsalz, Chloramphenicol, Glycin, Glutathion, Kanamycin A-Sulfat, Milchpulver, Silbernitrat
Fisher Scientific, Loughborough, UK	Essigsäure, Ethanol <i>pro analysi</i> (p. a.), Isopropanol p. a.
Fluka/Sigma Aldrich, München, DE	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Harnstoff, Imidazol, Kaliumdihydrogenphosphat
IBA Lifesciences, Göttingen, DE	Anhydrotetracyclin (AHT), d-Desthiobiotin
INTAS, Göttingen, DE	HDGreen™ DNA-Dye
Invitrogen, Darmstadt, DE	Dimethylsulfoxid (DMSO)
Merck, Darmstadt, DE	Ammoniumperoxodifulfat (APS), Bis-Acrylamid, Coomassie, Brillantblau R-250, 1,4-Dithioerythritol (DTT), Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), Triton X-100
Serva, Heidelberg, DE	Natriumdodecylsulfat
Sigma Aldrich, München, DE	Ammoniumbicarbonat (ABC), β-Mercaptoethanol, Glutaraldehyd, Glycerin, NZ-Amine® AS
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Ameisensäure (FA), Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), Pierce™ TCEP-HCL, N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED, ACROS Organics™)

## 2.1.2 Nährmedien

Die zu untersuchenden *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme wurden je nach Versuch in M9-Minimalmedium, NZA-Vollmedium oder LB-Vollmedium kultiviert.

**Tabelle 2.2: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer**

Lösung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g Bacto Trypton Penton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l A. dest.
LB-Agar	15 g Bacto™ Agar ad 1 l LB-Medium
Hochosmolares LB-Medium (2 M NaCl)	10 g Bacto Trypton Penton 5 g Hefeextrakt 116,88 g NaCl ad 1 l A. dest.
NZA-Medium	10 g N-Z-Amine 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l A. dest.
NZA-Agar	15 g Bacto™ Agar ad 1 l NZA-Medium
M9-Salze	42 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 15 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 g NaCl 5 g NH <sub>4</sub> Cl ad 1 l A. dest.
M9-Minimalmedium	200 ml M9-Salze 2 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> 20 ml 20 % Glukose 100 µl 1 M CaCl <sub>2</sub> ad 1 l A. dest.
Phosphate Buffered Saline (PBS, 10x)	200 mM Na-Phosphate (Mix) 1,5 M NaCl pH 6,8

Je nach Bedarf wurden dem Medium Antibiotika zu Selektionszwecken und/oder weitere Zusätze wie Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) bzw. Anhydrotetracyclin (AHT) zugegeben.

## 2.1.3 Antibiotika und weitere Medienzusätze

Alle Zusätze waren als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und wurden den Medien erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf mindestens 50 °C zugefügt.

**Tabelle 2.3: Liste und Konzentrationen der verwendeten Antibiotika**

Antibiotikum	Endkonzentration (Stocklösung, Lösungsmittel)
Ampicillin	200 µg/ml (200 mg/ml, <i>A. dest.</i> )
Chloramphenicol	30 µg/ml (30 mg/ml, 70% EtOH p. a.)
Kanamycin	100 µg/ml (100 mg/ml, <i>A. dest.</i> )
Spectinomycin	50 µg/ml (50 mg/ml, 70% EtOH)
Tetrazyklin	10 µg/ml (10 mg/ml, 70% EtOH p. a.)

Induzierbare Stämme wurden mit IPTG oder AHT induziert. Das IPTG wurde als 1 M Stammlösung in *A. dest.* gelöst und sterilfiltriert. Je nach Versuchsbedingung wurden Expressionsstämme mit einer Endkonzentration von 10 µM bis 1 mM IPTG induziert. Das AHT wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml in Dimethylformamid (DMF) gelöst und sterilfiltriert. In dieser Arbeit wurde eine Endkonzentration von 200 ng AHT/ml Kultur zur Induktion der Expression genutzt.

### 2.1.4 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5 aufgeführt.

**Tabelle 2.4 Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp	Referenz/Hersteller
SoluBL21 (D3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Novagen, Merck, Darmstadt, Deutschland (DE)
BW30270	<i>F<sup>-</sup> lambda- ilvG- rfb-50 rph+ fnr+</i>	CGSC- The Coli Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT, USA
DH5α	<i>F<sup>-</sup> supE44 ΔlacU169 deoR [φ80lacZΔM15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 (res<sup>-</sup> mod<sup>+</sup>)</i>	(Hanahan, 1983)
MC4100	<i>F<sup>-</sup> araD139 Δ(araF-leu)U169 rpsL150 deoC1 relA1 ptsF25 flbB5301 rbsR</i>	(Casadaban, 1976)
TOP10	<i>F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG λ-</i>	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 2.5: Deletionsstämme

Stamm	Relevanter Genotyp	Konstruktion	Referenz/Hersteller
JB26	BW30270 <i>degP::kan ppiD::tet</i>	<i>degP::kan</i> aus KU98, <i>ppiD::tet</i> aus TM50	Dr. Juliane Weski (Weski und Ehrmann, 2012) supplemental material)
JB48	BW30270 <i>dsbA::kan degP::tet</i>	<i>dsbA::kan</i> aus CS64, <i>degP::Tn10</i> aus AB15	Dr. Juliane Weski (Weski und Ehrmann, 2012) supplemental material)
JB53	BW30270 <i>tsp::kan degP::tet</i>	<i>tsp::kan</i> aus MG1655 <i>tsp::kan</i> , <i>degP::Tn10</i> aus AB15	Dr. Juliane Weski (Weski und Ehrmann, 2012) supplemental material)
JB60	BW30270 <i>dsbA::kan surA::cm</i>	<i>dsbA::kan</i> aus CS64, <i>surA::cm</i> aus MM12	Dr. Juliane Weski (Weski und Ehrmann, 2012) supplemental material)
JB63	BW30270 <i>ptrA::kan surA::cm</i>	<i>ptrA::kan</i> aus MG1655 <i>ptrA::kan</i> , <i>surA::cm</i> aus MM12	Dr. Juliane Weski (Weski und Ehrmann, 2012) supplemental material)
JB65	BW30270 <i>yfgC::kan surA::cm</i>	<i>yfgC::kan</i> aus JW279, <i>surA::cm</i> aus MM12	Dr. Juliane Weski (Weski und Ehrmann, 2012) supplemental material)

## 2.1.5 Vektoren und Plasmide

Die in dieser Arbeit zur Klonierung und Genexpression verwendeten Vektoren und Plasmide sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: Verwendete Vektoren und Plasmide

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
pCDF-Duet1	Zwei <i>multiple cloning sites</i> (MCS) unter T7-Promotor, lac-Operator, lac-Gen, Spectinomycin-Resistenz	Spectinomycin	Novagen, Merck, Darmstadt, DE
pCS19	pQE60 von Qiagen mit <i>lacIq</i> -Gen	Ampicillin	Dr. Christoph Spiess (Spiess <i>et al.</i> , 1999)
pCS21	pCS19 mit <i>degPS210A</i>	Ampicillin	Dr. Christoph Spiess (Spiess <i>et al.</i> , 1999)
pDsbA-his	pASK-KO (pASK-IBA32 ohne ompA-Signalsequenz und His-Tag) mit <i>dsbA</i>	Ampicillin	Dr. Juliane Weski
pHK630	<i>dsbA</i> C His10 mit P151T-Mutation	Spectinomycin	Dr. Feras Hatahet, Boston, MA, USA
pMM80	Periplasmatische Domäne von <i>ppiD</i> , <i>surA</i> Signalsequenz, 6 His-Tag	Tetrazyklin	Dr. Martin Mondigler
pTspS452A-his	pASK-KO (pASK-IBA32 ohne ompA-Signalsequenz und His-Tag) mit <i>tspS452A</i>	Ampicillin	Dr. Juliane Weski

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
pYcdB	pASK-IBA6C, DNA Sequenz ohne Signalsequenz eingebracht durch <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>	Chloramphenicol	Dr. Michael Meltzer
pYfgCE137Q	pASK-IBA32 mit <i>yfgCE137Q</i>	Ampicillin	Dr. Christiane Lütticke
pYB001	pCS19 mit Spectinomycin-Resistenz statt Ampicillin-Resistenz	Spectinomycin	Diese Arbeit
pYB002	pYB001 mit <i>degPS210A</i>	Spectinomycin	Diese Arbeit
pYB003	pYB001 mit <i>degQS187A</i>	Spectinomycin	Diese Arbeit
pYB004	pYB001 mit <i>tspS452A</i>	Spectinomycin	Diese Arbeit
pYB005	pYB001 mit <i>yfgCE137Q</i>	Spectinomycin	Diese Arbeit
pYB006	pYB001 mit <i>dsbA</i>	Spectinomycin	Diese Arbeit
pYB007	pYB001 mit <i>dsbAP151T</i>	Spectinomycin	Diese Arbeit
pYB008	pYB001 mit der periplasmatische Domäne von <i>ppiD</i>	Spectinomycin	Diese Arbeit
pYB009	pYB001 mit <i>surA</i>	Spectinomycin	Diese Arbeit
pYB010	pYB001 mit <i>ptrAE91Q</i>	Spectinomycin	Diese Arbeit

### 2.1.6 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich, München, DE, bezogen und auf eine Konzentration von 100 µM in *A. dest.* gelöst. Sie sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

**Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Oligonukleotide**

In den Sequenzen beinhaltet Restriktionsschnittstellenanteile sind *kursiv* und **fett** dargestellt. Zu mutierende Basenpaare sind unterstrichen und **fett** aufgeführt.

Name	Nukleotidsequenz (5'-3')	Verwendung
smR-XhoI_for smR-AhdI-CS19_rev	AAAAAA <b>CTCGAGG</b> TGGCCGGATCCTTGCGGC TTTTTT <b>GACTCCCCGTC</b> ATTGAAAAGGAAGAGT	Klonierung
Seq_for_ppiD-pMM80 Seq_rev_ppiD-pMM80	GTATGGCGACCGATATG GATACCGTTATAGCGGCTGT	Sequenzierung Ausgangsplasmid
Seq_DsbA_630_for Seq_DsbA_630_rev	CGGCGCAGTATGAAGATGGTAAAC GTTAACAAACATCGCCGGAAC	Sequenzierung Ausgangsplasmid
DegQ-NcoI_2_for DegQ-BglII_rev	TTAATT <b>CCATGGC</b> GAAACAAACCCAGC TTTTTT <b>AGATCT</b> ACGCATCAGCAGATAG	Klonierung
degQS187A-mut_for degQS187A-mut_rev	GCCACCTCTGGCATTGTT <b>G</b> CCGCATTAGGCC GCAGC GCTGCGGCCTAATGCGG <b>C</b> AACAATGCCAGAG GTGGC	Oligomutagenese
DsbAP151T_NcoI_for DsbAP151T_HindIII_rev	AAAAAA <b>CCATGGC</b> TAAAAAGATTTGGCTG TTTTTT <b>AAGCTTT</b> TAAATGGTGATGGTGATG	Klonierung
ppiD_pD_NcoI_for ppiD_pD_HindIII_rev	AAAAAA <b>CCATGGC</b> GAACTGGAAAACGCTG TTTTTT <b>AAGCTTT</b> TATTGCTGTTCCAGCGCATC	Klonierung



Name	Nukleotidsequenz (5'-3')	Verwendung
ptrA-BamHI_for2	AAAAAAGGATCCCCCGCAGCAC	Klonierung
ptrA-BgIII_rev	TTTTTTTAGATCTCTCATTCTTTTCACTC	
pQE-eigen_FP	GCTTTGTGAGCGGATAAC	Sequenzierung
ptrA_Seq_FP2	GTAATCCGGTGCAGCAG	
ptrA_Seq_FP3	GATGCTAAAGCAGTAAAGG	
ptrAE91Q-mut_for	GCTGGCACATTACCTG <u>CAG</u> CATATGAGTCTGATG	Oligomutagenese
ptrAE91Q-mut_rev	CATCAGACTCATATG <u>CTG</u> CAGGTAATGTGCCAAGC	
SurA-NcoI_2_for	TTAATTCCATGGCGAACTGGAAAACGC	Klonierung
surA-BgIII_rev	TTTTTTTAGATCTGTTGCTCAGGATTTTAAC	

### 2.1.7 Aktivatorpeptide

Synthetisch hergestellte Peptide wurden mit N-terminaler Acetylierung von der Firma Intavis, Tübingen DE, bezogen oder von der AG Kaiser, Universität Duisburg-Essen, Campus Essen, DE, hergestellt.

**Tabelle 2.8: Verwendete Aktivatorpeptide**

Name	Sequenz	Herkunft
YcdB	DYFGSALLRV	AG Kaiser
YWF	DNRLGLVYWF	Intavis, Tübingen, DE

### 2.1.8 Antikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 2.9, die verwendeten Sekundärantikörper in Tabelle 2.10 aufgeführt.

**Tabelle 2.9: Verwendete Primärantikörper**

Bezeichnung	Organismus	Verdünnung	Herkunft
αPpiD	Kaninchen	1:1.000	Laborsammlung
Anti-SurA	Kaninchen	1:1.000	Laborsammlung

**Tabelle 2.10: Verwendete Sekundärantikörper**

Bezeichnung	Organismus	Verdünnung	Herkunft
Polyklonaler anti-Kaninchen Ig/AP	Ziege	1:10.000	DaKoCytomation, Glostrup, Dänemark

## 2.1.9 Enzyme, Größenstandards, Proteine & Substrate

**Tabelle 2.11: Liste der verwendeten Enzyme und Proteasen**

Enzym/Protease	Herkunft
Lysyl Endopeptidase (Lys-C) 125-05061	Wako Chemicals, Neuss, DE
Phusion High Fidelity Polymerase, F530L	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Applied Science, Mannheim, DE
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt a. M., DE
T4 DNA Ligase M202L	NEB, Frankfurt a. M., DE
Taq DNA Polymerase M0267L	NEB, Frankfurt a. M., DE
Trypsin V5113	Promega, Mannheim, DE

**Tabelle 2.12: Liste verwendeter Größenstandards**

Standard	Hersteller
HiMark Prestained HMW Standard	Invitrogen/Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Prestained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München, DE
Unstained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München, DE
Quick-Load® 2-Log DNA Ladder	NEB, Frankfurt, DE

**Tabelle 2.13: Liste der verwendeten gereinigten Proteine**

Protein	Stamm	Plasmid	Reinigung
DegP	MA001	pCS20	Dr. Melisa Merdanovic
DegPS210A	JB26, JB48, JB53	pYB002	Diese Arbeit
DegQ	BL21	DegQ_wt	Marcell Müller
DegQS187A	JB26, JB48, JB53	pYB003	Diese Arbeit
DsbA	JB48, JB60	pYB006	Diese Arbeit
DsbAP151T	BW30270, JB48, JB60	pYB007	Diese Arbeit
PpiD periplasmatische Domäne	BW30270, JB26	pYB008	Diese Arbeit
PtrAE91Q	JB63	pYB010	Diese Arbeit
SurA	BW30270, JB60, JB63, JB65	pYB009	Diese Arbeit
Prc	BL21 Rosetta2	pTsp-his	Christina Au Yeung
PrcS452A	JB53	pYB004	Diese Arbeit
EfeB	SoluBL21	pYcdB	Diese Arbeit
BepAE137Q	JB65	pYB005	Diese Arbeit

**Tabelle 2.14: Liste der verwendeten Protein- und Peptidsubstrate**

Protein/Peptid	Hersteller
$\alpha$ -Casein	Sigma-Aldrich, München, DE
$\beta$ -Casein	Sigma-Aldrich, München, DE
Rinderserumalbumin (BSA), A3059/4378	Sigma-Aldrich, München, DE

## 2.1.10 Komplettsysteme

Tabelle 2.15: Liste der verwendeten Komplettsysteme

Komplettsystem	Hersteller
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren, DE
NucleoSpin® Gel Extraction	Macherey-Nagel, Düren, DE
NucleoSpin® PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, DE
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, DE
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, DE
Roti®-Nanoquant	Roth, Karlsruhe, DE

## 2.1.11 Allgemeine Instrumentation

Agarosegelelektrophoresekammer	Peqlab, Erlangen, DE
ÄKTA-FPLC	GE Healthcare, Freiburg, DE
ÄKTApure	GE Healthcare, Freiburg, DE
Analysewaage XS105 DualRange	Mettler-Toledo, Gießen, DE
Assistent Rollenmischer RM 5, Nr. 348	Karl Hecht KG, Sondheim/Röhn, DE
„Assistent“-Wippschüttler, 348/1	Karl Hecht KG, Sondheim/Röhn, DE
Autoklav	BeliMed, Mühldorf am Inn, AUT
French Press-Zelle FA-032	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
FRENCH® Press FA-078A	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
Geldokumentationssystem Gel iX Imager	INTAS, Göttingen, DE
Gelelektrophorese-Apparatur	Bio-Rad, München, DE
Heizblock 1201/1202	Alpha Laboratories Ltd, Hampshire, UK
Horizontalschüttler VXR Vibrax	IKA, Staufen, DE
Inkubationsschüttler Innova 44	New Brunswick, New Jersey, USA
Inkubationsschüttler Multitron Standard	Infors GmbH, Einsbach, DE
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen, DE
Magnetrührer RSM-01HS	Phoenix Instrument, Effretikon, CH
Massenspektrometer Orbitrap Elite 1000	Thermo Fisher, Darmstadt, DE
NGC™ Chromatographiesystem	Bio-Rad, München, DE
PAGE-Kammer Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München, DE
pH-Meter Seven Compact	Mettler Toledo, Gießen, DE
Pipetten Eppendorf Research plus	Eppendorf, Hamburg, DE
Rotor (JA-25.5)	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Rotor (JLA 9.1000)	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Scanner	Canon, Krefeld, DE
Spannungsgeber E802 Power Supply	Consort, Turnhout, BE
Spannungsgeber PowerPac 200	Bio-Rad, München, DE
Spannungsgeber PowerPac™ HC	Bio-Rad, München, DE
Spannungsgeber PowerStation 300 Plus	Labnet International, Inc., Edison USA
SpectraMax M5	Molecular Devies, Sunnyvale, USA
SpeedVac Concentrator 5301-R	Eppendorf, Hamburg, DE

Spektrometer GENios Pro	Tecan, Crailsheim, DE
Spectrophotometer NanoDrop 1000	PeqLab, Erlangen, DE
Spektrophotometer SmartSpec Plus	Bio-Rad, München, DE
Standzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, DE
Standzentrifuge Avanti JE	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Thermocycler T Personal	Biometra, Göttingen, DE
ThermoMixer® C (mit Thermo Top)	Eppendorf, Hamburg, DE
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, DE
Tischzentrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg, DE
Tischzentrifuge Sprout	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, DE
Ultraschallgerät Sonopuls	Bandelin, Berlin, DE
Ultrazentrifuge Optima MAX-XP	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Vakuumpumpe Typ N811KN.18	KNF Neuberger, Freiburg, DE
Vortex Minishaker MS2	IKA, Staufen, DE
Waage BJ1200C	Precisa, Dietikon, CH
Waage KERN 770	Kern, Balingen-Frommern, DE
Western-Blot Apparatur	Bio-Rad, München, DE
Western Blot Apparatur Trans-Blot® SD	Bio-Rad, München, DE
Western Blot Apparatur XCell4 SureLock Midi Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA

Alle nicht aufgeführten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

## 2.1.12 Sonstige Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
HiLoad 16/60 Superdex 75 (120 ml)	GE Healthcare, Freiburg, DE
HiLoad 26/60 Superdex 200 (324 ml)	GE Healthcare, Freiburg, DE
HiTrap™ IEX Selection Kit, 17-6002-33	GE Healthcare, Freiburg, DE
Laborsäule XK 16/20	GE Healthcare, Freiburg, DE
MonoQ 5/50 GL, 17-5166-01	GE Healthcare, Freiburg, DE
Ni-NTA Superflow, 30430	Qiagen, Hilden, DE
NuPAGE® Novex® Midi Protein Gels (3-8 % Tris-Acetate bzw. 10 % Bis-Tris)	Novex Life Technologies, Darmstadt, DE
Omnifix Spritzen (10 mL)	Braun, Melsungen, DE
PD Spin Trap G-25, 28-9180-04GE	Healthcare, Freiburg, DE
Pipettenspitzen Biosphere® Low Retention 10 µl, 20 µl, 200 µl und 1000 µl mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht, DE
POROS® 50 HS	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Protino® Ni-TED 150 und 2000 Packed Columns	Macherey-Nagel, Düren, DE
Protino® Ni-TED Resin, 745200	Macherey-Nagel, Düren, DE
PVDF Membran	Amersham/GE Healthcare, München, DE
Reaktionsgefäße 1,5- und 2-ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße 5-ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Regenerated Cellulose Membrane (RC55), 0,45 µm Porengröße	GE Healthcare, Freiburg, DE
SFCA bottle top filters 500 ml	Thermo Fisher, Darmstadt, DE

Strep-tactin High binding superflow, 2-1208-025  
 Superdex 200 10/300 GL (24 ml)  
 Superdex 75 10/300 GL (24 ml)  
 Ultrazentrifugationsröhrchen Vivaspin 500, 2, 6,  
 20 (MWCO 50/30/10/3 kDa PES Membranen)

IBA Life Sciences, Göttingen, DE  
 GE Healthcare, Freiburg, DE  
 GE Healthcare, Freiburg, DE  
 Sartorius, Göttingen, DE

## 2.1.13 Software

**Tabelle 2.16: Liste der verwendeten Software**

Software	Hersteller
CodonCode Aligner Demo	Codon Code Corporation, Centerville, USA
EndNote™ X9	Clarivate Analytics, Stamford, USA
Microsoft® Office für Mac 2010/2017	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Photoshop® Elements 11	Adobe System Inc, San Jose, USA
Serial Cloner Version 2.6.1	Open Source (Serial Basics)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Der Umgang und die Kultivierung der Bakterienstämme erfolgten unter sterilen Bedingungen. Es wurde bei allen Arbeitsgängen die Vorschriften des Gentechnikgesetzes für das Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen (GvOs) (S1) eingehalten. Alle temperaturstabilen Materialien wurden im Autoklaven (20 min, 121 °C, 2-3 bar) hitzesterilisiert. Temperaturinstabile Lösungen wurden mittels einer 0,2 µm Membran sterilfiltriert. Der mikrobiologische Abfall wurde vor der Entsorgung durch Hitzesterilisierung inaktiviert.

#### 2.2.1.1 Lagerung von Plasmiden

Die Lagerung der verwendeten Plasmide in Benutzung erfolgte in *A. dest.* bei -20 °C. Für eine längere Lagerungsdauer erfolgte die Aufbewahrung in einem Nidrigsalz-Puffer (Elutionspuffer der jeweiligen Komplettsysteme (2.1.10)) bei -80 °C.

#### 2.2.1.2 Lagerung von Stämmen

Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte als Dimethylsulfoxid (DMSO)-Kultur oder Glycerin-Kultur bei -80 °C. Eine Flüssigkultur wurde mit einer Endkonzentration von

10 % (v/v) DMSO bzw. 20 % (v/v) Glycerin versetzt und die Suspension direkt eingefroren.

### **2.2.1.3 Ausstreichen von Bakterienstämmen**

Eine hitzesterilisierte Impföse wurde über eine gefrorene DMSO-Stammkultur gekratzt und die anhaftenden Bakterien danach auf einer NZA- bzw. LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Agarplatten enthielten gegebenenfalls ein entsprechendes Antibiotikum zu Selektionszwecken und wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### **2.2.1.4 Anzucht von Flüssigkulturen**

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte neben dem Festmedium (LB- oder NZA-Agarplatten) in Flüssigkulturen. Dazu wurde eine Einzelkolonie in bis zu 5 ml LB- oder NZA-Medium überimpft und auf einem Brutroller zur gewünschten Zelldichte inkubiert. Flüssigkulturen größerer Volumina wurden mit den Vorkulturen auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 - 0,1 angeimpft und auf einem Inkubationsschüttler bei 180 rpm inkubiert. Die Temperatur zur Anzucht betrug je nach Versuchsbedingungen 18 °C bis 43 °C. Bei einer Anzucht von mindestens 12 h wurden die Kulturen als Übernachtkultur (üN-Kultur) bezeichnet.

### **2.2.1.5 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen**

Die Zelldichte einer *E. coli*-Flüssigkultur wurde bestimmt durch die photometrische Messung einer 1 ml Probe bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ). Eine  $OD_{600}$  von 1 entspricht dabei einer *E. coli*-Zellzahl von ca.  $10^9$  Zellen pro ml Kultur (Miller, 1972).

### **2.2.1.6 Transformation**

Bakterienzellen können durch eine natürliche Kompetenz in der Lage sein freie DNA aufzunehmen oder durch verschiedene Verfahren kompetent gemacht werden. Die Aufnahme der freien DNA durch kompetente Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. In Rahmen dieser Arbeit wurden die Methoden der TSS-Transformation und der Hitzeschocktransformation angewandt. Daneben gibt es noch das Verfahren der Elektroporation.

### 2.2.1.6.1 Hitzeschocktransformation und Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Transformation der Stämme DH5 $\alpha$ , Top10 und BW30270 wurde das gängige Verfahren der Hitzeschocktransformation genutzt. Bei diesem Verfahren werden die chemisch behandelten Bakterienzellen kurzzeitig einer hohen Temperatur von 42 °C (Hitzeschock) ausgesetzt. Dadurch öffnen sich Poren in der Membran und die Aufnahme der zugegebenen Plasmid-DNA wird ermöglicht.

Die kompetenten Zellen für die Hitzeschocktransformation wurden durch die Behandlung mit Rubidiumchlorid hergestellt. Der zu transformierende *E. coli*-Stamm wurde in einer  $\bar{u}$ N-Kultur (5 ml) bis zur stationären Wachstumsphase angezogen und damit eine Flüssigkultur von 50 ml auf die gewünschte OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft. Diese wurde bei 37 °C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> = 0,5-0,7) angezogen. Danach wurde die Kultur für 10 min auf Eis gelagert und anschließend für 10 min bei 4.000 rpm und 4 °C in einer Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in einem Drittel des ursprünglichen Kulturvolumens (hier etwa 17 ml) eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach einem zweiten fünfzehnminütigen Kühschritt auf Eis wurden die *E. coli*-Zellen erneut zentrifugiert (10 min, 4.000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde in 1/12,5 Anteil des ursprünglichen Kulturvolumens (hier etwa 4 ml) RF2-Lösung aufgenommen und für 15 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden in 100  $\mu$ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1  $\mu$ l Plasmidlösung bzw. 5-10  $\mu$ l eines Ligations- oder PCR-Ansatzes vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte für 90 Sekunden (s) ein Hitzeschock bei 42 °C. Der Ansatz wurde im Anschluss sofort für 5 min auf Eis gelagert und danach mit 900  $\mu$ l Medium versetzt. Es folgte eine Inkubation der Bakterien für etwa 1 h bei 37 °C und 600 rpm um eine phänotypische Expression zu ermöglichen. Im Anschluss wurden 100  $\mu$ l des Ansatzes sowie ein Konzentrat (Zentrifugation bei 3.000 rpm für 3 min, Überstand verworfen, Pellet im Rest des Überstands wieder aufgenommen) auf jeweils einer Platte mit Selektivmedium ausplattiert und  $\bar{u}$ N bei 37 °C inkubiert.

RF1-Lösung	RF2-Lösung
100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 30 mM KAc 15% Glycerin pH 5,8 mit HAc	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15% Glycerin pH 6,8 mit NaOH

Das MnCl<sub>2</sub> wurde sterilfiltriert und erst nach dem Autoklavieren der Lösung hinzugefügt.

#### 2.2.1.6.2 TSS-Transformation

Für die Transformationen der verwendeten Mutanten wurde die sogenannte TSS-Transformation (*transformation and storage solution*) nach Chung *et al.* (Chung *et al.*, 1989) durchgeführt.

Dafür wurden 50 µl eiskaltes 2x TSS-Medium mit vorgekühlten 50 µl Empfängerzellen einer Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase gemischt. Die Zellen sind sofort kompetent und die Transformation erfolgte durch die Zugabe von 1-2 µl Plasmid-DNA. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis wurde der Ansatz zur phänotypischen Expression für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend ausplattiert. Die Platten wurden im Anschluss üN bei der entsprechenden Temperatur bebrütet.

2x TSS-Medium
20 % (w/v) PEG-6000 10 % (v/v) DMSO 100 mM MgSO <sub>4</sub> ad LB-Medium

Das PEG-6000 wurde direkt im NZA-Medium gelöst und anschließend autoklaviert. Das DMSO und sterilfiltriertes MgSO<sub>4</sub> wurden erst nach dem Autoklavieren hinzupipettiert. Die Lösung konnte für mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden.

#### 2.2.1.7 Produktion der verwendeten Proteine in E. coli

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden mit Ausnahme von EfeB auf Grundlage von Plasmiden mit IPTG-induzierbarem Promotor produziert. Das gewünschte Gen befindet sich auf den Expressionsplasmiden unter der Kontrolle eines vom Lac-Repressor regulierten Promotors. Neben dem Promotor beinhalten die Plasmide damit auch ein lac-Operon und das *lacI*-Gen, das für den Lac-Repressor kodiert. Durch die Bindung des Lac-Repressors an den Operator wird die Expression des Zielgens unterbunden. IPTG wirkt als Induktor indem es den Lac-



Repressor bindet. Dadurch kann dieser nicht mehr an den Operator binden und die Transkription des Zielgens wird ermöglicht.

Für die Produktion von Proteinen in den *E. coli*-Doppelmutanten wurden die jeweiligen Stämme mittels TSS-Transformation frisch mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert (2.2.1.6.2). Der Transformationsansatz wurde in 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben und über den Tag bei 30 °C auf dem Brutroller inkubiert. Die Kultur wurde am Abend genutzt um 100 ml antibiotikahaltiges LB-Medium zu inokulieren. Diese Vorkultur wurde üN bei 30 °C und 180 rpm im Inkubator bebrütet. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur für das Ansetzen der Expressionskultur genutzt. Es wurden 750 ml LB-Medium ohne Antibiotikum auf eine  $OD_{600}=0,1$  angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6-0,8 angezogen. Dann wurde die Expression des Zielgens mit 100 µM IPTG induziert. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die Bakterienzellen zusätzlichem Stress ausgesetzt. In Abhängigkeit von der Doppelmutante wurde den Bakterienzellen entweder 250 ml warmes LB-Medium (42 °C) zugegeben und die Kultur bei 42 °C weiter inkubiert, oder 250 ml hochosmolares LB-Medium (2 M NaCl, Endkonzentration in der Kultur 0,5 M NaCl) bei gleichbleibender Temperatur zugefügt. Nach weiteren 3 h (mit zwei Ausnahmen, siehe Tabelle 2.17) wurden die Bakterienzellen geerntet (2.2.1.8).

Des Weiteren wurden die Proteine DsbAP151T, PpiD periplasmatische Domäne (im folgenden einfachheitshalber PpiD genannt) und SurA in dem Stamm BW30270 und EfeB in dem Stamm SoluBL21 DE3 produziert.

Die Bakterien wurden für die Produktion der Proteine DsbAP151T, PpiD und SurA mit dem entsprechenden Expressionsplasmid frisch chemisch transformiert (2.2.1.6.1) und eine 5 ml-Vorkultur mit dem Transformationsansatz in mit Spectinomycin versetztem LB-Medium bei 30 °C über den Tag angezogen. Am Abend wurde die 5 ml-Kultur in 100 ml frisches LB Medium überführt und üN bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden am folgenden Tag je 2 l LB-Medium auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 inokuliert und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6-0,8 bei 30 °C unter Schütteln bebrütet. Anschließend wurde die Expression des Zielgens mit 100 µM IPTG induziert und die Bakterienzellen üN bei 18 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet (2.2.1.8).

Die SoluBL21-Zellen wurden ebenfalls chemisch transformiert (2.2.1.6.1). Es wurde mit dem Transformationsansatz eine 5 ml-Kultur Chloramphenicol enthaltenes NZA-Medium versetzt und üN bei 37 °C auf dem Brutroller bebrütet. Am folgenden Tag

## MATERIAL UND METHODEN

wurde mit den 5 ml eine 100 ml-Kultur antibiotikahaltiges NZA-Medium versetzt und diese Kultur bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Expressionskultur (10 l) wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 üN unter Schütteln bei 18 °C angezogen. Am folgenden Tag wurde die Expression von *efeB* mit 200 ng AHT/ml Expressionskultur induziert und die Kultur für weitere 4 h bei 28 °C unter Schütteln zur Proteinproduktion inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen wie unter 2.2.1.8 beschrieben geerntet.

Die Bedingungen für die Produktion der verschiedenen Proteine aus den Deletionsmutanten und den Stämmen BW30270 und SoluBL21 sind in Tabelle 2.17 und Tabelle 2.18 aufgeführt.

**Tabelle 2.17: Bedingungen zur Produktion der verschiedenen Proteine aus Doppelmutanten**

Protein	Deletionsstamm	Genotyp	Stressbedingung	Dauer
DegPS210A	JB26	<i>degP ppiD</i>	0,5 M NaCl	3 h
DegPS210A	JB48	<i>degP dsbA</i>	0,5 M NaCl	3 h
DegPS210A	JB53	<i>degP tsp</i>	0,5 M NaCl	5 h
DegQS187A	JB26	<i>degP ppiD</i>	0,5 M NaCl	3 h
DegQS187A	JB48	<i>degP dsbA</i>	0,5 M NaCl	3 h
DegQS187A	JB53	<i>degP tsp</i>	0,5 M NaCl	3 h
DsbA	JB48	<i>degP dsbA</i>	0,5 M NaCl	6 h
DsbA	JB60	<i>surA dsbA</i>	42 °C	3 h
DsbAP151T	JB48	<i>degP dsbA</i>	0,5 M NaCl	3 h
DsbAP151T	JB60	<i>surA dsbA</i>	42 °C	3 h
PpiD periplasmatische Domäne	JB26	<i>degP ppiD</i>	0,5 M NaCl	3 h
PtrAE91Q	JB63	<i>surA ptrA</i>	0,5 M NaCl	3 h
SurA	JB60	<i>surA dsbA</i>	42 °C	3 h
SurA	JB63	<i>surA ptrA</i>	0,5 M NaCl	3 h
SurA	JB65	<i>surA yfgC</i>	0,5 M NaCl	3 h
PrcS452A	JB53	<i>degP tsp</i>	0,5 M NaCl	3 h
BepAE137Q	JB65	<i>surA yfgC</i>	0,5 M NaCl	3 h

**Tabelle 2.18: Bedingungen zur Produktion der verschiedenen Proteine aus BW30270 und SoluBL21**

Protein	Stamm	Kulturvolumen/ Induktion	Dauer/Temperatur
DsbA	BW30270	2 l LB, 100 µM IPTG	üN, 18 °C
PpiD periplasmatische Domäne	BW30270	2 l LB, 100 µM IPTG	üN, 18 °C
SurA	BW30270	2 l LB, 100 µM IPTG	üN, 18 °C
EfeB	BL21	4 l NZA, 200 ng AHT/ml	4 h, 28 °C

Der Erfolg der Genexpression wurde mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-PAGE, 2.4.5) überprüft.

### 2.2.1.8 Bakterienzelllagerung und -aufschluss

Im Anschluss an die Proteinproduktion wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation bei 4.000 xg und 4 °C für 10 min geerntet und in eisgekühltem LEW (*Lysis-Equilibration-Wash*)-Puffer aufgenommen. Bei der Produktion der Proteine in den Doppelmutanten wurden 10 ml LEW-Puffer für die Resuspension des Pellets benutzt, bei der Produktion im größeren Maßstab im Stamm BW30270 und SoluBL21 40-50 ml. Die Zellen wurden durch Ultraschall (Bandelin Sonupuls, MS-73, 40%, 6x20 s) aufgeschlossen und das entstandene Rohlysat durch einen zweiten Zentrifugationsschritt (20.000 xg, 4 °C, 20 min) geklärt, indem Zelltrümmer sedimentiert wurden. Der filtrierte Überstand wurde für die darauffolgende Reinigung (ab 2.4.1) verwendet. Alternativ wurde das Pellet der geernteten Zellen vor dem Zellaufschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

---

#### LEW-Puffer

50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl pH 8
---

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Es wurden in dieser Arbeit grundlegende molekularbiologische Methoden angewendet, deren Durchführung nach den Angaben der jeweiligen Hersteller der Enzyme und Komplettsysteme bzw. nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) erfolgte.

Neu erzeugte und amplifizierte DNA-Konstrukte wurden mittels Sequenzierung bei der Firma SeqLab (Köln, DE) auf ihre Richtigkeit überprüft.

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden mit UltraPure™ DNase/RNase-freiem destilliertem Wasser (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt.

## 2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

### 2.3.1.1 Analytische Plasmidpräparation (Mini-Präp)

Für die Isolierung analytischer Mengen an Plasmid-DNA wurden mit einer transformierten *E. coli*-Einzelkolonie 5 ml antibiotikahaltiges NZA-Medium inokuliert und üN bei 37 °C im Brutroller inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen der üN-Kultur durch einen Zentrifugationsschritt für 3 min bei 3.000 rpm geerntet. Die Präparation der DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *NucleoSpin® Plasmid Kit* (Macherey-Nagel, Düren, DE) oder dem *Qiaprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden, DE). Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der aufgereinigten DNA erfolgte durch eine photometrische Messung (2.3.4). Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.3.1.2 Präparative Plasmidpräparation (Midi-Präp)

Bei der präparativen Plasmidpräparation wurden 5 ml antibiotikahaltiges NZA-Medium mit einer transformierten *E. coli*-Einzelkolonie angeimpft und für 8 h bei 37 °C im Brutroller inkubiert. Diese Vorkultur wurde zu 100 ml frischem NZA-Medium gegeben und bei 37 °C und 180 rpm üN bebrütet. Die Zellen wurden bei 4.000 rpm und 4 °C für 20 min pelletiert. Die DNA wurde nach Herstellerangaben mit dem *NucleoBond® Xtra Midi Kit* (Macherey-Nagel, Düren, DE) isoliert und die Qualität und Konzentration photometrisch bestimmt (2.3.4). Im Anschluss wurde die DNA bei -80 °C gelagert.

## 2.3.2 PCR

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zu analytischen oder präparativen Zwecken wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) verwendet. Dazu werden spezielle Oligonukleotide (*Primer*) entworfen, die den zu amplifizierenden Bereich bestimmen. Die Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide und die Länge des PCR-Produktes werden durch Anpassung des PCR-Programms berücksichtigt.

### 2.3.2.1 Präparative PCR

Bei der präparativen PCR wurde bereits vorhandene Plasmid-DNA oder genomische DNA des Bakterienstamms MC4100 als Vorlage (*Template*) genutzt. Neben komplementären Bereichen zum Zielgen enthielten die verwendeten Primer Sequenzen für Restriktionsschnittstellen um eine spätere Klonierung in den Zielvektor zu ermöglichen.

Die PCR wurde nach Herstellerangaben mit der *Phusion High Fidelity Polymerase* (Thermo Fisher Scientific) im *Thermocycler T Personal* (Biometra) durchgeführt.

PCR-Ansatz		PCR-Programm		
Komponente	Menge	Schritt	Temperatur	Zeit
3'-Primer (10 µM)	1 µl	Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
5'-Primer (10 µM)	1 µl	Denaturierung	98 °C	10 s
DNA- <i>Template</i>	10-50 ng	<i>Annealing</i>	45-70 °C	30 s
Polymerase	1 µl	Elongation	72 °C	30s/1000 bp
dNTPs (10 mM)	1 µl	Finale Elongation	72 °C	10 min
5x Puffer	10 µl		4 °C	∞
DMSO (optional)	1,5 µl			
<i>A. dest.</i>	ad 50 µl			

} 30  
Zyklen

Alternativ konnte ein zweistufiges PCR-Programm eingesetzt werden, falls das einstufige Programm keinen Erfolg zeigte. Dabei wurden die ersten fünf Zyklen mit einer niedrigen *Annealing*temperatur von 50 °C durchlaufen, bevor in den darauffolgenden Zyklen eine höhere *primerspezifische* Temperatur benutzt wurde.

Die Größe der amplifizierten PCR-Produkte wurde im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese (2.3.6) kontrolliert. Es folgte eine Aufreinigung der Produkte mit dem *NucleoSpin® PCR Clean-up Kit*, *NucleoSpin® Gel Extraction Kit* (beides Macherey-Nagel), *QIAquick PCR Purification Kit* oder dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* (beides Qiagen) nach Herstellerangaben.

### 2.3.2.2 Analytische PCR (Kolonie-PCR)

Mit Hilfe der Kolonie-PCR wurde überprüft, ob das gewünschte Zielgen in den Zielvektor ligiert (2.3.5) wurde.

Dafür wurden Proben von vereinzelt auf einer Masterplatte ausgestrichenen Einzelkolonien in 20 µl *A. dest.* hypotonisch lysiert. Die Proben wurden 5 min bei 98 °C inkubiert und 10 min (Tischzentrifuge 13.000 rpm, RT) zentrifugiert. Im Anschluss

wurden 2 µl des Überstandes als *Template* mit 8 µl Mastermix für die PCR-Reaktion eingesetzt.

Die Kolonie-PCR wurde nach Herstellerangaben mit der *Taq Polymerase* (NEB) im *Thermocycler T Personal* (Biometra) durchgeführt und die Amplifikationsprodukte im Anschluss auf einem Agarosegel analysiert (2.3.6).

Mastermix (für 10 Ansätze)		PCR-Programm		
Komponente	Menge	Schritt	Temperatur	Zeit
3'-Primer (10 µM)	1 µl	Initiale Denaturierung	94 °C	4 min
5'-Primer (10 µM)	1 µl	Denaturierung	94 °C	10 s
Polymerase	5 µl	<i>Annealing</i>	45 °C	30 s
dNTPs (10 mM)	2 µl	Elongation	72 °C	60s/1000 bp
10x Puffer	10 µl	Finale Elongation	72 °C	10 min
<i>A. dest.</i>	ad 80 µl		4 °C	∞

} 30  
Zyklen

### 2.3.3 Oligomutagenese

Zur Einführung von ortsspezifischen Mutationen in Genen und somit Punktmutationen in den kodierten Proteinen wurden komplementäre Oligonukleotide generiert, die mittig die gewünschte Mutation aufweisen. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Mit dem Unterschied, dass 100-200 ng Template-DNA eingesetzt wurden, wurde der PCR-Ansatz und das Programm vergleichbar zur präparativen PCR (2.3.2.1) durchgeführt. Nach der PCR wurden dem Ansatz 2 µl *DpnI* zugesetzt, um methylierte Ausgangs-DNA zu verdauen. Der Verdau wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Nach der Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 80 °C folgte eine Transformation kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock (2.2.1.6.1). Positive, in diesem Fall mutierte Klone, wurden durch Sequenzierung identifiziert.

### 2.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nucleinsäuren wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Spektralphotometer *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher) gemessen. Der jeweilige Puffer der Nucleinsäure diente als Referenz. Das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Als Maß der Reinheit von DNA wurde der Quotient

der Absorption bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) berechnet. Eine DNA-Probe galt somit als rein, wenn der berechnete Quotient bei 1,8 lag.

### 2.3.5 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Bei den in dieser Arbeit benutzten Restriktionsenzymen handelt es sich um aus Bakterien isolierte Endonukleasen des Typs II, die DNA innerhalb spezifischer, meist palindromischer Sequenzmotive schneiden. Wird die Doppelstrang-DNA asymmetrisch gespalten, entstehen einzelsträngige 3'- und 5'-Überhänge, die zueinander komplementär sind und durch Ligation wieder zusammengefügt werden können. Da die verschiedenen Restriktionsenzyme in den meisten Fällen unterschiedliche Überhänge generieren, ermöglicht die Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen das gerichtete Zusammenfügen von DNA-Fragmenten.

Alle Restriktionsenzyme wurden bezüglich Inkubationszeit, Inkubationstemperatur und Pufferbedingungen den Herstellerangaben (NEB) entsprechend eingesetzt. Die PCR-Produkte, als auch der Zielvektor wurden mit den passenden Endonukleasen inkubiert und die geschnittenen Produkte anschließend direkt mittels *PCR Purification Kit* (Macherey-Nagel) oder durch Gel-Extraktion (2.3.6) nach Herstellerangaben gereinigt. Nach der Konzentrationsbestimmung (2.3.4) der gereinigten DNA-Proben wurden die geschnittenen PCR-Produkte mit dem geschnittenen Vektor ligiert. Für die Ligation wurde das *Rapid DNA Ligation Komplettsystem* (Roche) nach Herstellerangaben eingesetzt.

### 2.3.6 Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur analytischen oder präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Agarosegelelektrophorese genutzt. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrats der DNA lassen sich DNA-Fragmente zur Anode hin elektrophoretisch auftrennen. Da das Agarosegel ein Maschennetzwerk bildet, das kleinere Fragmente schneller passieren lässt, ist die Auftrennungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Größe des DNA-Fragments.

Für die Agarosegelelektrophorese wurden Gele mit 0,8 – 1,2 % (w/v) Agarose verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurde die Agaroselösung mit 5 µl

HDGreen/100 ml Volumen versetzt und zu einem Flachbettgel gegossen. Der DNA-interkalierende Farbstoff HDGreen™ (INTAS) ermöglichte die Visualisierung der DNA unter langwelligem UV-Licht (302 nm). Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen eines 6x DNA-Probenpuffers versetzt, aufgetragen und anschließend bei einer konstanten Spannung von 120 V in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente wurde durch einen Vergleich mit dem 2log-DNA-Marker ermöglicht. Für präparative Zwecke wurde die gewünschte DNA unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels *NucleoSpin® Gel Extraction* (Macherey-Nagel) oder *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt.

TAE-Puffer (50x)	DNA-Ladepuffer (6x)
2 M TRIS 1 M Essigsäure 0,05 M EDTA pH8	30 % (v/v) Glycerol 0,15 M EDTA pH 8,0 0,3 % (w/v) Bromphenolblau

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Allgemeine Angaben zu Proteinreinigungen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Proteinreinigungen wurden mit käuflichen, fertig gepackten Protino® Ni-TED-Tropfsäulen und an den FPLC-Anlagen Bio-Rad NGC™ sowie ÄKTApure-FPLC bei 4 °C durchgeführt. An den Anlagen konnte der Proteingehalt der verschiedenen Reinigungsschritte durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt werden. Zusätzlich wurden die Reinigungsschritte mittels SDS-PAGE (2.4.5) überprüft.

Die Proben wurden zudem vor der Größenausschlusschromatographie bei 21.000 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert.

Die Proteinlösungen wurden nach der Reinigung zur massenspektrometrischen Analyse (2.4.12) vorbereitet, oder aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Alle durchgeführten Proteinreinigungen basieren auf einer Kombination von Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie, deren Theorie im Folgenden kurz erläutert wird.



### 2.4.1.1 Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie werden Proteine durch einen Affinitätstag an einer Matrix gebunden, die für den jeweiligen Tag spezifisch ist.

Durch die Zugabe eines speziellen Eluenten wird das gebundene Zielprotein durch kompetitive Bindung von der Säule eluiert.

**Tabelle 2.19: Liste der verwendeten Affinitätstags und Säulenmaterialien**

Affinitätstag	Ligand/Säulenmaterial	Eluent
Strep II (WSHPQFEK)	StrepTactin-Sepharose	Desthiobiotin
Poly-Histidin (HIS <sub>6</sub> )	Chelatierte Nickel-Ionen/Agarose, Silica	Imidazol

### 2.4.1.2 Anionenaustauschchromatographie

Bei den Anionenaustauschern ist eine kationische Gruppe kovalent an eine polymere Matrix gebunden. Das neutralisierende Anion ist dagegen nur ionisch gebunden und somit durch andere Ionen reversibel austauschbar. Der in dieser Arbeit verwendete Anionenaustauscher ist eine MonoQ Säule (GE Healthcare), aus der Gruppe der stark basischen Anionenaustauscher.

### 2.4.1.3 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) beruht auf dem Prinzip, dass kleinere Proteine besser in die Poren der Dextran-Agarose-Matrix eindringen und daher erst bei einem größeren Puffervolumen aus der Matrix eluieren als Proteine mit höherer molekularer Masse. Das Elutionsvolumen der Proteine steigt somit gegenläufig zur abnehmenden molekularen Masse.

### 2.4.1.4 Ultrafiltration

Sollte das Probenvolumen vor der Größenausschlusschromatographie oder vor dem Aliquotieren der gereinigten Proteine verringert werden, wurde eine Ultrafiltration bei 3.200 xg bei 4 °C durchgeführt. Dazu wurden Vivaspin-Zentrifugalkonzentratoren unterschiedlicher Größe mit der Proteingröße angepasstem Ausschlussvolumen (MWCO, *molecular weight cut off*) genutzt. Elutionspuffer und Moleküle unterhalb des MWCO passieren die semipermeable Polyethersulfon-Membran (PES) während das Zielprotein zurückbleibt.

## 2.4.2 Reinigung der verwendeten Proteine aus Doppelmutanten

Die Reinigung der verschiedenen Proteine aus den Deletionsmutanten erfolgte durch eine Affinitätschromatographie über einen C-terminalen His-Tag, der an das Säulenmaterial der Protino® Nickel-Tris-Carboxymethylethylenediamin (Ni-TED) Tropfsäulen (Macherey-Nagel) bindet. Dafür wurde der gefilterte Überstand nach dem Zellaufschluss (2.2.1.8) auf die zuvor mit LEW äquilibrierte Säule aufgetragen. Der Durchlauf wurde erneut über die Ni-TED Säule gegeben. Bei den DegPS210A-Reinigungen aus JB26, JB48 und JB53 wurden seriell zwei Säulen verwendet. Mit Ausnahme der PtrAE91Q- und der BepAE137Q-Reinigung, wo eine kleinere Protino® Ni-TED 150 Säule verwendet wurde, wurden alle anderen Reinigungen mit Protino® Ni-TED 2000 Säulen durchgeführt. Nichtbindende Proteine wurden im Anschluss mit einem zehnfachen Säulenvolumen an LEW-Puffer von der Säule gewaschen. Es folgte ein Waschschrift mit dem dreifachen Säulenvolumen 5 mM Imidazol in LEW. Danach erfolgte die Elution der Proteine mittels Elutionspuffer. Zunächst mit einem dreifachen Säulenvolumen an 150 mM Imidazol in LEW und danach mit 250 mM Imidazol in LEW. Die einzelnen Fraktionen der Reinigung, wie der Durchfluss, die Waschschrift und die Elutionproben wurden mittels SDS-PAGE (2.4.5) analysiert. Es wurde mit den Elutionsfraktionen 150 mM und 250 mM jeweils getrennt weitergearbeitet. Eine Ausnahme bildeten hier die ersten Reinigungen von DegPS210A aus JB48 und JB53, sowie DsbA aus JB48, da hier die beiden Elutionsfraktionen noch gepoolt und als eine Fraktion weiterverwendet wurden. Die Volumina der einzelnen Fraktionen wurde mit Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren mit der Proteingröße angepasstem MWCO auf ca. 1 ml reduziert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge für 1 h bei 4 °C und 168.000 xg. Im Anschluss wurde der Überstand sofort abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurden etwa 100 µl zurückgelassen, um nichts vom Pellet mitaufzunehmen.

Die beiden Elutionsfraktionen wurden im Anschluss daran durch Größenausschlusschromatographie an der FPLC-Anlage Bio-Rad NGC™ getrennt voneinander weiter gereinigt. Um Aggregate zu entfernen wurde die konzentrierte Elutionsfraktion direkt vor dem Auftragen auf die SEC zentrifugiert (16.000 xg, 10 min, 4 °C). Zur Beladung wurde in allen Fällen ein *Loop* mit einem Volumen von 250 µl genutzt, durch den die Probe im Anschluss auf eine, mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte, Chromatographie-

säule aufgetragen wurden. Für die Proteine DsbA und DsbAP151T wurde eine Superdex 75 10/300 GL genutzt, für alle anderen Proteine eine Superdex 200 10/300 GL.

Ausgewählte Fraktionen wurden erneut mittels SDS-PAGE (2.4.5) analysiert. Es wurden die Fraktionen zur weiteren Verwendung berücksichtigt, in denen das zu reinigende Protein in potentiell heterooligomeren Komplexen bis zum eigentlichen Protein- oder Proteinhexamer $peak$  vorkam. Anhand des Elektropherogramms und der SDS-PAGE wurde der Bereich der weitergenutzten Fraktionen festgelegt. Jeweils fünf benachbarte Fraktionen dieses Bereichs wurden gepoolt um die Anzahl an Proben für die massenspektrometrische Analyse zu reduzieren. Nach einer erneuten SDS-PAGE wurden die gepoolten Proben durch eine Silberfärbung (2.4.7) des Gels analysiert. Es wurde der Proteingehalt bestimmt (2.4.4), bevor sie für die massenspektrometrische Analyse (2.4.12.1) vorbereitet wurden.

LEW-Puffer	Elutionspuffer	Gelfiltrationspuffer
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl pH 8	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 150 mM NaCl pH 8

## 2.4.3 Reinigung der verwendeten Proteine aus BW30270 und SoluBL21

### 2.4.3.1 Reinigung von DsbAP151T, PpiD und SurA aus BW30270

Die Proteine DsbAP151T, PpiD und SurA wurden in BW30270-Zellen in je 2 l LB-Medium mit Spectinomycin über Nacht bei 18 °C produziert (2.2.1.7). Das erhaltene Pellet wurde in 40 ml LEW resuspendiert und nach Zellaufschluss durch Ultraschall und Zentrifugation (2.2.1.8) wurde der Überstand mit den FPLC-Anlagen Bio-Rad NGC™ oder ÄKTApure (GE Healthcare) auf eine Nickel-Nitrilotriacetat (Ni-NTA) oder Ni-TED Säule geladen. Dafür wurden mit Ni-NTA Superflow (Qiagen) oder Protino® Ni-TED Resin (Macherey-Nagel) gepackte Laborsäulen XK 16/20 genutzt. Die Reinigungen der Proteine fanden jeweils über einen C-terminale His-Tag statt.

**DsbAP151T**

Der Überstand wurde mit einer ÄKTApure auf eine mit LEW-Puffer äquilibrierte Ni-NTA Säule (5 ml Material, XK 16/20) geladen. Die Säule wurde mit LEW-Puffer gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit LEW-Puffer mit einer Imidazolkonzentration von 10 mM. Anschließend wurde das Protein mit einem Imidazolgradienten (10 mM-250 mM, 150-ml-Gradient) eluiert. Die potentiell Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt, auf 2,5 ml einkonzentriert (Vivaspin 20 MWCO 10.000) und durch Größenausschlusschromatographie (*HiLoad* 16/60 Superdex 75) an der Bio-Rad NGC™ weiter gereinigt. Die Zielprotein-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mit 10 mM DTT versetzt. Es folgte eine zweite SEC mit einer kleineren Säule (Superdex 75 10/300) und Gelfiltrationspuffer der mit 10 mM DTT versetzt wurde. Die Fraktionen, die die größte Menge und gleichzeitig das reinste Protein enthielten wurden vereinigt und das DTT durch mehrmaliges Aufkonzentrieren in Vivaspin 2 MWCO 10.000 und erneutes Auffüllen mit LEW nahezu vollständig entfernt. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.4.4), die Proteine aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

**PpiD**

Der Überstand wurde mit einer ÄKTApure auf eine mit LEW-Puffer äquilibrierte Ni-TED Säule (5 ml Material, XK 16/20) geladen. Die Säule wurde zuerst mit LEW-Puffer gewaschen und danach mit LEW-Puffer mit einer Imidazolkonzentration von 20 mM. Das Protein wurde anschließend mit einem Imidazolgradienten (20 mM-500 mM, 150-ml-Gradient) eluiert. Da die Reinigung über Ni-TED nicht zielführend war, wurde eine Reinigung über Ni-NTA angeschlossen. Dazu wurden die ersten 35 Fraktionen gepoolt und auf 3 ml einkonzentriert (Vivaspin 20 MWCO 30.000). Durch die Zugabe des zuvor aufgefangenen Durchflusses und der Waschschrift, wurde die Imidazolkonzentration so gering, dass die Probe in diesem Zustand auf die mit LEW-Puffer äquilibrierte Ni-NTA (5 ml Material, XK 16/20) geladen werden konnte. Die Säule wurde mit LEW- und Hochsalzpuffer gewaschen und das Protein anschließend mit einer Kombination aus Imidazolstufen- und -gradientenprotokoll (20 mM-50 mM-100 mM-150 mM, danach 80-ml-Gradient auf 500 mM) eluiert. Die potentiell Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt, auf 2 ml einkonzentriert (Vivaspin 20 MWCO 30.000) und durch Größenausschlusschromatographie (*HiLoad* 16/60 Superdex 75) an der Bio-Rad NGC™ weiter gereinigt. Alle proteinhaltigen

Fractionen wurden vereinigt, in Vivaspin 20 MWCO 30.000 auf etwa 2 ml einkonzentriert und mittels PD-10 Säulen in Tris-Puffer umgepuffert. Im Anschluss wurde eine Anionenaustauschchromatographie mit einer MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) an der Bio-Rad NGC™ durchgeführt. Das gebundene Protein wurde mit einem NaCl-Gradienten (0 M bis 1 M, 20-ml-Gradient) eluiert. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.4.4), die Proteine aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### SurA

Der Überstand wurde mit einer Bio-Rad NGC™ auf eine mit LEW-Puffer äquilibrierte Ni-NTA Säule (7 ml Material, XK 16/20) geladen. Die Säule wurde mit LEW- und Hochsalzpuffer gewaschen und das Protein anschließend mit einem Imidazolgradienten (bis 250 mM, 70-ml-Gradient) eluiert. Da die Reinigung über Ni-NTA nicht zielführend war, wurde eine Reinigung über Ni-TED angeschlossen. Dazu wurden die Fractionen mit dem meisten Protein, unter anderem des Zielproteins, gepoolt, einkonzentriert (Vivaspin 20 MWCO 10.000) und mittels PD-10 Säulchen auf LEW umgepuffert. Im Anschluss wurde eine mit LEW-Puffer äquilibrierte Ni-TED Säule (10 ml Material, XK 16/20) beladen, gewaschen und das Protein anschließend mit einem Imidazolgradienten (bis 250 mM, 70-ml-Gradient) eluiert. Die potentiell Zielprotein enthaltenden Fractionen wurden gepoolt, auf 2 ml einkonzentriert (Vivaspin 20 MWCO 10.000) und durch Größenausschlusschromatographie (*HiLoad* 16/60 Superdex 75) an der Bio-Rad NGC™ weiter gereinigt. Die Zielprotein enthaltenden Fractionen wurden vereinigt und in Vivaspin 20 MWCO 10.000 auf etwa 5 ml einkonzentriert. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.4.4), die Proteine aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

<p><b>LEW-Puffer</b></p> <p>50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 300 mM NaCl pH 8</p>	<p><b>Hochsalzpuffer</b></p> <p>50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M NaCl pH 8</p>	<p><b>Elutionspuffer</b></p> <p>50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8</p>
<p><b>Gelfiltrationspuffer</b></p> <p>50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 150 mM NaCl pH 8</p>	<p><b>Tris-Puffer</b></p> <p>50 mM TRIS pH 8</p>	<p><b>Tris-NaCl-Puffer</b></p> <p>50 mM TRIS 1 M NaCl pH 8</p>

### 2.4.3.2 Reinigung von EfeB aus SoluBL21

Das Protein EfeB wurde in SoluBL21-Zellen in 10 l NZA-Medium mit Chloramphenicol für 4 h bei 28 °C produziert (2.2.1.7). Das erhaltene Pellet wurde in 50 ml LEW-Puffer resuspendiert und mittels Ultraschall die Zellen lysiert. Nach Zentrifugation (2.2.1.8) wurde der Überstand mit einer ÄKTApure auf eine äquilibrierte Strep-Tactin-Superflow-Säule (17,5 ml Material, Xk 16/20) geladen. Die Säule wurde mit LEW- und Hochsalzpuffer gewaschen und das Protein anschließend mit Elutionspuffer (2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, mit einem Zentrifugalkonzentrator Vivaspin 20 MWCO 10.000 auf 2 ml eingengt und durch Größenausschlusschromatographie (Superdex 200 16/60) weiter gereinigt. Die Zielprotein-enthaltenden Fraktionen wurden im Anschluss gepoolt, es wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.4.4) und die Proteine aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

<b>LEW-Puffer</b> 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl pH 8	<b>Hochsalzpuffer</b> 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M NaCl pH 8
<b>Elutionspuffer</b> 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 2,5 mM Desthiobiotin pH 8	<b>Gelfiltrationspuffer</b> 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 150 mM NaCl pH 8

### 2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration proteinhaltiger Lösungen wurden zwei verschiedene Methoden benutzt. Entweder wurde die Proteinkonzentration mit der kalorimetrischen Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt, oder durch den Vergleich mit bekannten Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) auf einer SDS-PAGE.

Die Konzentrationsbestimmung nach Bradford erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des Roti®-Nanoquant Komplettsystems (Carl Roth). Dazu wurden 50 µl einer verdünnten Proteinprobe mit 200 µl 1x Bradford Reagenz versetzt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss wurde die OD bei 590 nm und bei 450 nm an einem Spektralphotometer gemessen und deren Quotient ( $A_{590}/A_{450}$ )

bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors durch die Berechnung mit einer ebenfalls gemessenen BSA-Eichgerade (1 µg/ml bis 100 µg/ml) ermittelt.

Alternativ wurden auf einer SDS-PAGE (2.4.5) verschiedene Mengen der Proteinlösung mit definierten Mengen [µg] von BSA aufgetragen und nach Färbung des Gels (2.4.6) durch einen optischen Vergleich die Proteinkonzentration bestimmt.

### **2.4.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (Laemmli, 1970) mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, kurz SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Durch Zugabe des Detergens SDS werden die Eigenladungen des Proteins überdeckt. Die Anzahl der gebundenen SDS-Moleküle ist dabei proportional zur Proteingröße, wodurch eine konstante negative Ladungsverteilung erreicht wird. In einer diskontinuierlichen Polyacrylamidmatrix können die Proteine durch dieses konstante Masse-/Ladungsverhältnis in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Ausbildung höherer Proteinstrukturen wird zu einen durch das SDS sowie durch die Reduktion von evtl. vorhandenen Disulfidbrücken durch Dithiothreitol (DTT) und durch Erhitzen der Proben auf 95 °C unterbunden.

Je nach Zielprotein wurden 10-15%ige Trenngele genutzt, die jeweils mit 4,5%igen Sammelgelen überschichtet wurden (Tabelle 2.20). Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) im Ansatz dienten dabei als Startermolekül bzw. Katalysator bei der Acrylamidpolymerisation. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/5 Volumen eines 5x SDS-Probenpuffers und 30 mM DTT versetzt und dann für 5 min bei 95 °C denaturiert. Um die Größe der Zielproteine abzuschätzen wurde neben den aufgetragenen Proben ein Molekulargewichtsstandard (Prestained oder Unstained SDS-PAGE Standard, Bio-Rad) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150-200 V in 1x SDS-Laufpuffer bzw. 1x MES- oder 1x MOPS-Puffer im Fall von gekauften 10 % Bis-Tris NuPAGE® Novex® Midi Protein Gels (Invitrogen). Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit einer Coomassie-Färbung (2.4.6), Silberfärbung (2.4.7) oder in einer Western Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion (2.4.8).

<b>SDS-Laufpuffer (10x)</b>	<b>SDS-Sammelgelpuffer (4x)</b>	<b>SDS-Trenngelpuffer (4x)</b>
1,92 M Glycin 333 mM TRIS 1 % (w/v) SDS	0,5 M TRIS pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS	1,5 M TRIS pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
<b>SDS-Probenpuffer (5x)</b>	<b>MES-Laufpuffer (20x)</b>	<b>MOPS-Laufpuffer (20x)</b>
0,3 M TRIS pH 6,8 10 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerol 0,4 % (w/v) Bromphenolblau	1 M MES pH 7,3 1 M TRIS 2 % (w/v) SDS 20 mM EDTA	1 M MOPS pH 7,7 1 M TRIS 2 % (w/v) SDS 20 mM EDTA

**Tabelle 2.20: Zusammensetzung für zehn SDS-Gele**

Komponente	Trenngel (10/12/15 %)	Sammelgel (4,5 %)
Trenngelpuffer (4x)	10 ml	/
Sammelgelpuffer (4x)	/	5 ml
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	13,3/16/20 ml	3 ml
APS (10 %)	200 µl	140 µl
TEMED	80 µl	70 µl
A. dest.	ad 40 ml	ad 20 ml

## 2.4.6 Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung von Proteinen, die mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt wurden, konnten diese mit Coomassie-Brillant-Blau R-250 unspezifisch angefärbt werden. Dazu wurde eine verkürzte Variante der Coomassiefärbung nach Fairbanks angewandt (Fairbanks *et al.*, 1971). Die Polyacrylamidgele wurden zur Färbung für 30 s in Puffer A in einer Mikrowelle (400 W) erhitzt und anschließend für 5 min auf einem Kippschüttler bei RT inkubiert. Danach wurden die Gele für je 30 s nacheinander in Puffer B, C und D erhitzt. Die Gele verblieben bis zum gewünschten Maß an Entfärbung in Puffer D.

<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>
25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250	10 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,005 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
<b>Puffer C</b>	<b>Puffer D</b>
10 % (v/v) Essigsäure 0,002 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250	10 % (v/v) Essigsäure



### 2.4.7 Silberfärbung

Durch die Silberfärbung nach Blum (Blum *et al.*, 1987) wird eine sehr sensitive Detektion von niedrig konzentrierten Proteinmengen ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *NuPAGE® Novex® Midi Protein Gels* (Invitrogen) für die Silberfärbung verwendet (2.4.5.) Die zu färbenden Gele wurden für 30 min in Fixierlösung inkubiert und anschließend zwei Mal für je 10 min in 30 % Ethanol (v/v) und einmal in *A. dest.* gewaschen. Danach wurden die Gele exakt 1 min in 0,02 % Thiosulfatlösung (w/v) inkubiert und dann dreimal kurz (20 s) mit *A. dest.* gewaschen. Anschließend wurden die Gele für 20 min in Silbernitratlösung geschwenkt und erneut dreimal für je 20 s in *A. dest.* gewaschen. Im Anschluss wurden die Gele bis zur gewünschten Färbung in Entwicklerlösung inkubiert, dann einmalig kurz mit *A. dest.* gewaschen und danach für 10 min in 5 % Essigsäure (v/v) inkubiert. Zuletzt wurden die Gele noch einmal für 10 min in *A. dest.* gewaschen. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt.

Fixierlösung	Silbernitratlösung
40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure 500 µl/l Formaldehyd (37 %)	0,2 % (w/v) Silbernitrat 750 µl/l Formaldehyd (37 %)
Entwicklerlösung	
3 % (w/v) Natriumcarbonat 0,0004 % (w/v) Natriumthiosulfat 500 µl/l Formaldehyd (37 %)	

### 2.4.8 Western Blot-Analyse und Immundetektion

Zur spezifischen Detektion einzelner Proteine wurden diese im Anschluss an eine SDS-PAGE (2.4.5) auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) der Firma Amersham übertragen. Dafür wurde das Elektroblob-Verfahren (*Semi-Dry*) mit dem Trans-Blot SD von Biorad entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Die PVDF-Membran wurde zunächst für 1 min in 100 % Methanol (v/v) aktiviert. Im Anschluss wurden die Membran, das Gel und das verwendete *Whatman* Papier mindestens 10 min in 1x Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h in Transferpuffer.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die Membran für mindestens 1 h in TBS-T mit 3 % BSA (w/v) bei RT inkubiert. Auf die einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper gegen das Zielprotein ebenfalls in Blockierlösung folgten drei Waschschriffe (je 5 min) in TBS-T. Der mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Sekundärantikörper wurde im Anschluss für eine Stunde appliziert und überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit TBS-T wieder entfernt. Es folgte ein fünfminütiger Inkubationsschritt in AP-Puffer. Alle Schritte wurden bei RT und unter Schütteln auf dem Horizontalschüttler durchgeführt. Die Entwicklung der Membran erfolgte in Entwicklerlösung durch die enzymatische Umwandlung der AP-Substrate 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) bis zum gewünschten Färbegrad. Im Anschluss an die Entwicklung wurden die Membranen ausgiebig in *A. dest.* gewaschen und danach getrocknet. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.9 und Tabelle 2.10 aufgeführt.

<p><b>Transferpuffer</b></p> <p>15 mM TRIS pH 8,3 120 mM Glycin 0,2 % (w/v) SDS</p>	<p><b>TBS-T</b></p> <p>30 mM TRIS pH 7,5 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween20</p>
<p><b>AP-Puffer</b></p> <p>100 mM TRIS pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl<sub>2</sub></p>	<p><b>Entwicklerlösung</b></p> <p>10 ml AP-Puffer 66 µl NBT (50 ng/ml in 70 % DMF) 33 µl BCIP (50 ng/ml in 100 % DMF)</p>

### 2.4.9 *Crosslink* Methode mittels Glutaraldehyd

Zur Bestimmung des oligomeren Zustandes von Proteinen, in diesem Fall von PpiD, wurde die *Crosslink* Methode verwendet. Die Proteine wurden dazu in HEPES-Puffer (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) für 5 min bei 37 °C auf dem Schüttler (350 rpm) inkubiert. Dann wurde der *Crosslinker* Glutaraldehyd (GA) in einer finalen Konzentration von 0,05 %, 0,1 % und 0,5 % (v/v) zu den Proteinen gegeben. GA besitzt zwei Aldehydgruppen, welche mit den Aminogruppen von Aminosäureresten reagieren können. Proteine, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, können somit kovalent miteinander verbunden werden. Die Vernetzung der Lysine wurde sofort (0 min), nach 2 min, 5 min und 10 min durch Zugabe von 1/5 Volumen der Stopplösung und eine Inkubation von 15 min bei RT

und 500 rpm beendet. Es folgte eine dreiminütige Inkubation bei 40 °C worauf die Proben dann mit 5x SDS-Probenpuffer und 2 µl Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) versetzt wurden. Die Proben wurden anschließend 5 min bei 75 °C erhitzt und danach mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt. Im Gegensatz zu den unter 2.4.5 beschriebenen Vorgehen wurden bei der *Crosslink* Methode 3-8 % Tris-Acetate *NuPAGE® Novex® Midi Protein Gels* (Invitrogen) und der 1x TA-Laufpuffer, sowie ein 1:20 verdünnter *HiMark Prestained HMW Standard* verwendet. Durch Silberfärbung (2.4.7) und Western Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion (2.4.8) wurden die Proteine visualisiert.

TA-Laufpuffer (10x)	HEPES-Puffer (5x)	Stopplösung
500 mM Tricin 500 mM TRIS pH 8,24 1 % (w/v) SDS	250 mM HEPES pH 7,5 605 mM NaCl	1 M TRIS pH 8

### 2.4.10 Degradationsassays

Um die proteolytische Aktivität von verschiedenen Proteasen in Bezug auf das Substrat EfeB unter Zugabe von Proteinen der Proteinqualitätskontrolle zu untersuchen wurden Degradationsassays durchgeführt. Die untersuchten Proteasen DegP (Dr. Melisa Merdanovic), DegQ (Marcell Müller) und Prc (Christina Au Yeung), sowie die verwendeten Faltungshelfer DsbAP151T, PpiD und SurA und das Substrat EfeB sind unter Tabelle 2.13 aufgeführt. Die Faltungshelfer und das Substrat wurden für die Degradationsassays aus den *E. coli*-Stämmen BW30270 und SoluBL21 gereinigt (Tabelle 2.18).

Im Fall von DegP und Prc wurde als Reaktionspuffer LEW-Puffer pH 8 und im Fall von DegQ Propionsäurepuffer pH 5,5 bei den Degradationsassays eingesetzt. Die Endkonzentration an Urea betrug bei DegP 1 M und bei DegQ, sowie Prc 1,5 M. Das Substrat EfeB wurde durch 8 M Urea denaturiert in den Assay eingesetzt. Es wurden jeweils Ansätze mit und ohne die Zugabe von Aktivatorpeptid hergestellt. Für die Proteasen DegP und Prc wurden 50 µM des Aktivatorpeptids YcdB, für die Protease DegQ 100 µM des Aktivatorpeptids YWF eingesetzt (Tabelle 2.8).

Die Kontrollen wurden jeweils einmal, die Proteolyseansätze dreimal angesetzt. Das Endvolumen jedes Ansatzes betrug 50 µl. Das Substrat in 8 M Urea (in *A. dest.*) wurde dem Ansatz als letztes zugesetzt, damit es bei den im Assay vorliegenden niedrigeren Ureakonzentrationen nicht spontan rückfalten kann bevor es mit der

Protease in Kontakt kommt. Die Ansätze wurden bei 37 °C und 350 rpm geschüttelt. Zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 15 min und 30 min wurden jeweils 10 µl Probe entnommen und wie unter 2.4.11 beschrieben mit Aceton gefällt.

LEW-Puffer	Propionsäurepuffer
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl pH 8	100 mM Propionsäure 150 mM NaCl pH 5,5

Tabelle 2.21: Ansatzschema für einen Degradationsassay mit Aktivatorpeptid am Beispiel DegP

	Kontrollen			Enzym + Faltungshelfer
	Substrat	Enzym	Faltungshelfer	
Enzym	/	1,5 µM	/	1,5 µM
Faltungshelfer	/	/	7,5 µM	7,5 µM
Aktivatorpeptid (YcdB)	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM
8 M Urea in <i>A. dest.</i>	Endkonz. 1 M	Endkonz. 1 M	Endkonz. 1 M	Endkonz. 1 M
EfeB in 8 M Urea	5 µM	/	/	5 µM
Puffer (LEW)	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl

### 2.4.11 Acetonfällung

Zur Generierung von Peptiden aus den Proben der Degradationsassays (2.4.10) wurden die entnommenen Proben zu dem sechsfachen Volumen an 100 % eiskaltem Aceton p. a. (60 µl) gegeben. Die Acetonfällung erfolgte üN bei -80 °C. Zur Separation von Proteinen und Peptiden wurden die Proben bei 21.000 xg und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Große Proteine (< 6 kDa) befanden sich danach im Pellet, während die Peptide im Überstand verblieben. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und anschließend lyophilisiert (Concentrator 5301, Eppendorf). Die so gewonnenen Proben wurden bei -20 °C gelagert, bevor sie für die massenspektrometrische Analyse von Peptidfragmenten (2.4.12.2) weiterverarbeitet wurden.

## 2.4.12 Massenspektrometrische Analysen

### 2.4.12.1 Massenspektrometrische Analysen von an Proteine der Proteinqualitätskontrolle gebundenen Proteinen

Zur Untersuchung, welche Proteine unter Stressbedingungen an die hier untersuchten Proteine binden, wurden massenspektrometrische Analysen der gewonnenen Proben (2.4.2) in Kooperation mit der *Analytics Core Facility* Essen (ACE, Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB), Universität Duisburg-Essen, Essen, DE) durchgeführt.

Dafür wurden 25 µl der erhaltenen Proben mit 25 µl Urea (8 M) in 100 mM Ammoniumbicarbonat (ABC)-Lösung versetzt. Die Proben wurden durch die Zugabe von TCEP (Endkonzentration 4 mM) bei 30 °C, 1300 rpm für 30 min reduziert. Im Anschluss wurden die Proben durch die Zugabe von Iodacetamid (IAM) alkyliert (11 mM, 30 °C, 1 h, 1300 rpm). Die Hydrolyse der Proteine erfolgte anschließend mit 200 ng Lys-C (Wako Chemicals) für 3 h bei 37 °C und 1300 rpm. Danach wurden die Proben mit 50 mM ABC-Lösung verdünnt, sodass die Urea Konzentration bei 1,1 M lag. Die Proteine wurden im Anschluss erneut hydrolysiert, diesmal durch die Zugabe von 200 ng Trypsin (Promega) üN bei 37 °C und 500 rpm. Die Hydrolyse wurde am darauffolgenden Tag durch die Zugabe von 5 % (v/v) Ameisensäure (formic acid, FA) beendet. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte durch Svenja Blaskowski (ACE, ZMB, Universität Duisburg-Essen, Essen, DE). Die entstandenen Peptide wurden beim *Stage Tipping* über C-18 Säulen entsalzt und danach in einem *Vakuum-Concentrator* (Eppendorf) getrocknet. Kurz vor der Messung wurden die Proben in 10 µl 0,1 % FA gelöst. Die Messung erfolgte an einem Orbitrap Elite Instrument (Thermo Fisher) gekoppelt an ein EASY-nLC 1000 Flüssigchromatographie (LC) System mit einer Nanospray Flex-Ion Ionenquelle (Thermo Fisher) (im Folgenden LC-MS). Die Messung der Proben, sowie die Identifikation der Peptide erfolgte mit der MaxQuant Software durch Dr. Farnusch Kaschani (ACE, ZMB, Universität Duisburg-Essen, Essen, DE). Proteine, die als *carry over* vorheriger Läufe ersichtlich waren, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

### 2.4.12.2 Massenspektrometrische Analyse von Peptidfragmenten

Die innerhalb der Degradationsassays (2.4.10) entstandenen Fragmente wurden nach der Acetonfällung (2.4.11) ebenfalls in Kooperation mit der *Analytics Core*

*Facility* Essen massenspektrometrisch analysiert, um die entstandenen Schnittstellen vor allem im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der Proteolyse zu untersuchen.

Die gefällten Proben wurden, wie schon unter 2.4.12.1 beschrieben, in 0,1 % FA aufgenommen, über C-18-Material aufgereinigt, mittels LC-MS massenspektrometrisch aufgetrennt und mit MaxQuant und MASCOT analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme des Tools *Utilities for Mass Spectrometry Analysis of Proteins* (UMSAP) von Dr. Kenny Bravo-Rodriguez (Bravo-Rodriguez *et al.*, 2018).

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die zuvor gesammelten ersten Hinweise auf ein potentielles Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli* weitergehend untersucht werden. Interessante Aspekte sind die Organisation des Netzwerks detaillierter aufzuklären, zu verifizieren und weiter auszubauen. Die in dieser Arbeit verwendeten Faltungsfaktoren und Doppelmutanten wurden auf Grundlage einer vorangegangenen Dissertation (Weski, 2010) ausgewählt. Die sieben Doppel-KO-Mutanten (*degP dsbA*, *degP tsp*, *degP yfgC*, *degP ppiD*, *surA dsbA*, *surA ptrA* und *surA yfgC*) zeigten in der Dissertation von Dr. Juliane Weski unter Stressbedingungen Probleme mit den Außenmembranproteinen FhuA, OmpW und LamB auf Proteinebene (Tabelle 3.1). In diesen Stämmen wurde entweder eine Reduktion der FhuA- oder OmpW-Menge in der Außenmembran detektiert, ohne, dass eine reduzierte Genexpression vorlag, oder die Stämme wiesen Unregelmäßigkeiten im LamB-Vorkommen auf. LamB lag dabei in manchen Doppel-KO-Stämmen nicht nur als Trimer, sondern auch als Monomer vor, oder war überhaupt nicht mehr nachweisbar.

**Tabelle 3.1: Ausgewählte Deletionsstämme und Stressbedingungen**

Die aufgeführten Deletionsstämme und die zugehörigen Stressbedingungen wurden auf Grundlage der Ergebnisse der Dissertation von Dr. Juliane Weski für die weitergehenden Untersuchungen dieser Arbeit ausgewählt. Es handelt sich hierbei um Stämme die potentiell unter Stressbedingungen Probleme mit Außenmembranproteinen auf Proteinebene aufweisen.

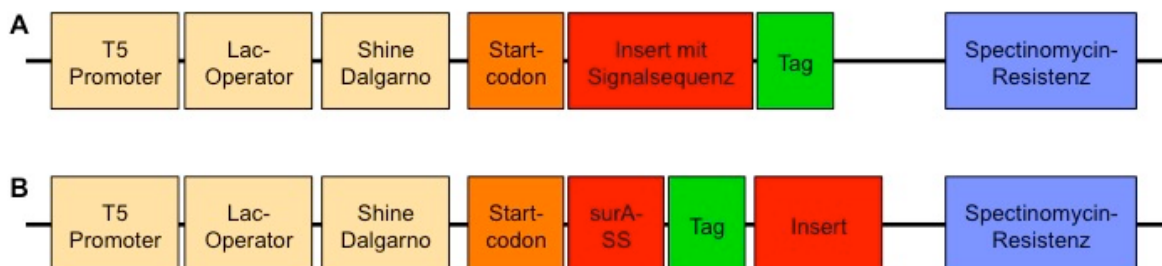
Deletionsstamm	Genotyp	Stressbedingungen
JB26	<i>degP ppiD</i>	Hyperosmolarität
JB48	<i>degP dsbA</i>	Hyperosmolarität und SDS/EDTA
JB53	<i>degP tsp</i>	Hyperosmolarität
JB55	<i>degP yfgC</i>	SDS/EDTA
JB60	<i>surA dsbA</i>	Temperatursensitivität in Vollmedium (42 °C)
JB63	<i>surA ptrA</i>	Hyperosmolarität
JB65	<i>surA yfgC</i>	Hyperosmolarität

Die vorliegende Arbeit hatte als Ziel, in den oben genannten Deletionsstämmen jeweils einen *Knockout* durch eine extrachromosomale Überexpression auszugleichen. Die dabei hergestellten Proteine sollten im Anschluss gereinigt und in Bezug auf die gebundenen Substrate massenspektrometrisch analysiert werden. Um

eine Proteolyse der Substrate zu verhindern, wurden bei den Proteasen enzymatisch inaktive Mutanten genutzt.

### 3.1 Konstruktion der Plasmide

Für die Bearbeitung der Aufgabenstellung mussten zunächst neue Plasmide hergestellt werden, die den Anforderungen für die Expression in den Doppel-KO-Stämmen entsprachen. Es durfte keine Antibiotika-Resistenz verwendet werden, die in den Deletionsstämmen (Chloramphenicol, Kanamycin und Tetrazyklin) verwendet wurde. Des Weiteren sollte das Antibiotikum Ampicillin vermieden werden, da es in den Bakterienzellen vermehrt Stress auslöst und die Membran instabil wird (persönliche Kommunikation mit Dr. Jens Bongard). Infolgedessen wurde das Antibiotikum Spectinomycin ausgewählt und die Resistenz für dieses Antibiotikum in den in der Laborsammlung vorhandenen pCS19 eingebracht. Das resultierende Plasmid pYB001 stellte die Grundlage für die Klonierung weiterer Plasmide dar, in die Gene eingebracht wurden, die für die benötigten Proteine kodieren (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: Schematische lineare Darstellung der Plasmide**

Dargestellt ist ein schematischer Aufbau der hergestellten Plasmide. Alle Plasmide weisen bis zum Startcodon den gleichen Aufbau von T5-Promoter, Lac-Operator und Shine Dalgarno-Sequenz auf (A und B). (A) In den meisten Fällen folgt das Insert mit Signalsequenz und ein 6xHis-Tag (pYB007\_DsbAPT 10xHis-Tag). (B) Eine Ausnahme bildet das Plasmid pYB008\_PpiD. Hier folgt auf das Startcodon die *surA*-Signalsequenz (*surA*-SS), ein 6xHis-Tag und dann als Insert die Gensequenz der periplasmatischen Domäne von *ppiD*. Die Spectinomycin-Resistenz weisen alle Plasmide auf (A und B).

Die vier Plasmide pYB002\_DegPSA, pYB004\_TspSA, pYB005\_YfgCEQ und pYB006\_DsbA wurden durch Umklonierung des Inserts nach Standardmethoden aus in der Laborsammlung vorhandenen Plasmiden (Tabelle 2.6) in den Leervektor pYB001 generiert.

Bei den Plasmiden pYB003\_DegQSA, pYB009\_SurA und pYB010\_PtrAEQ wurde das Insert durch PCR aus genomischer DNA des Stammes MC4100 amplifiziert.



Dafür wurden Primer genutzt, die die Sequenzen der benötigten Schnittstellen zum Einbringen in den Vektor enthielten. Es folgte ein gezielter Aminosäureaustausch (S→A bei Serinproteasen, E→Q bei Metalloproteasen) durch Oligomutagenese (2.3.3), sodass durch Expression der entsprechenden Plasmide die Proteine (DegQSA und PtrAEQ) mit inaktiver Proteasefunktion produziert werden.

Im Fall von pYB007\_DsbAPT und pYB008\_PpiD mussten die Bereiche um das Insert der in der Laborsammlung vorhandenen Plasmide (pMM80 und pHK630, Tabelle 2.6) zunächst sequenziert werden, um Klonierungsstrategien zu entwickeln. Dafür wurde jeweils am Anfang und am Ende des Inserts in das Plasmid hereinquenziert. Es wurden Oligonukleotide entworfen, die die für die Klonierung nötigen Restriktionsschnittstellen enthielten. Durch PCR mit den Ausgangsplasmiden als Template und den entworfenen Primern wurde das Insert amplifiziert und danach nach Standardmethoden in den Leervektor pYB001 kloniert. Die für Sequenzierung, Klonierung und Oligomutagenese verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Mit Ausnahme des Proteins PpiD weisen alle auf Grundlage der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide produzierten Proteine einen C-terminalen His-Tag auf. Nur PpiD hat aufgrund der Klonierungsstrategie einen N-terminalen His-Tag (Abbildung 3.1). Bei dem in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Protein PpiD handelt es sich nur um die periplasmatische Domäne des Proteins. Im Folgenden wird dieses Protein jedoch als PpiD bezeichnet.

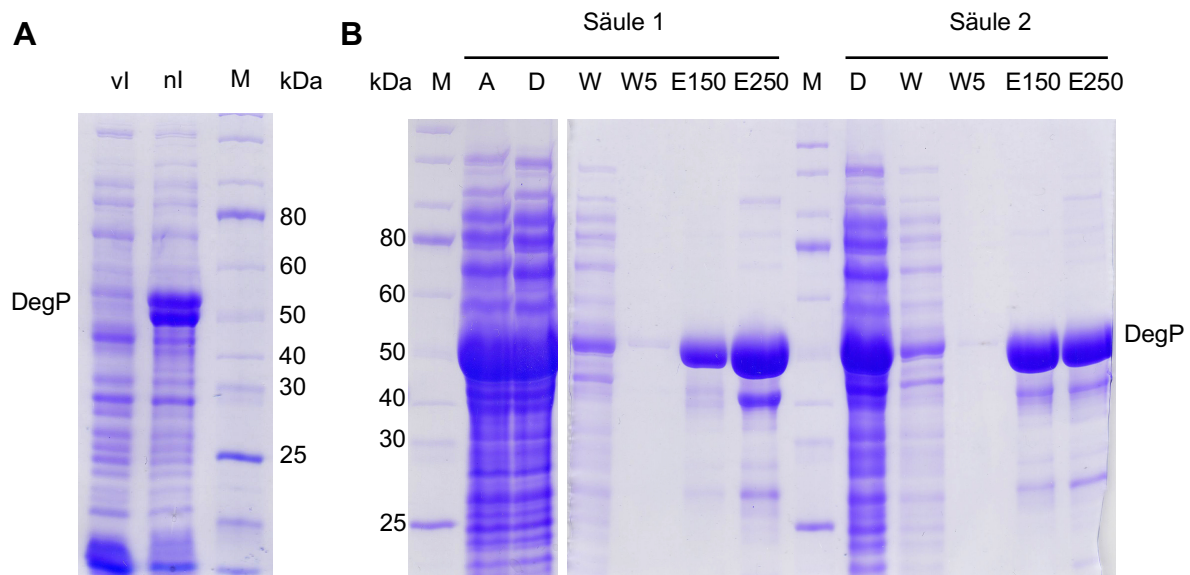
## **3.2 Proteinreinigungen aus Deletionsmutanten unter Stressbedingungen und massenspektrometrische Analysen**

### **3.2.1 DegPSA aus *degP*-Mutanten**

#### **3.2.1.1 Proteinreinigung von DegPSA aus JB48**

Für die Proteinreinigung wurde rekombinantes DegPSA in *E. coli* JB48-Zellen (*degP dsbA*) unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl) überproduziert. Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Reinigung des Proteins durch einen His-Tag mittels Affinitätschromatographie über zwei Protino® Ni-TED 2000-Säulen (2.4.2). Der Erfolg der

Reinigung wurde nach den jeweiligen Reinigungsschritten mit Hilfe der SDS-PAGE (2.4.5) und anschließender Coomassie-Färbung (2.4.6) kontrolliert. In Abbildung 3.2 ist für DegPSA aus JB48 exemplarisch der Verlauf einer Proteinreinigung aus den Doppel-KO-Stämmen dargestellt. Die Abbildung zeigt unter (A) die Induktion durch IPTG während der Produktion (nl) und unter (B) die jeweiligen Reinigungsschritte. Nach dem Auftragen des geklärten Zellysats (A=Auftrag) auf die Ni-TED-Säulen konnten Verunreinigungen mit Hilfe der anschließenden Waschschrte mit LEW-Puffer (W) und mit LEW-Puffer, der 5 mM Imidazol enthielt (W5), von der Säule entfernt werden. Durch die Steigerung der Imidazol-Konzentration im Puffer auf 150 mM und danach auf 250 mM wurde DegPSA eluiert. Das isolierte Protein zeigt in der SDS-PAGE eine elektrophoretische Auftrennung gemäß seines theoretischen Molekulargewichts von etwa 48 kDa.



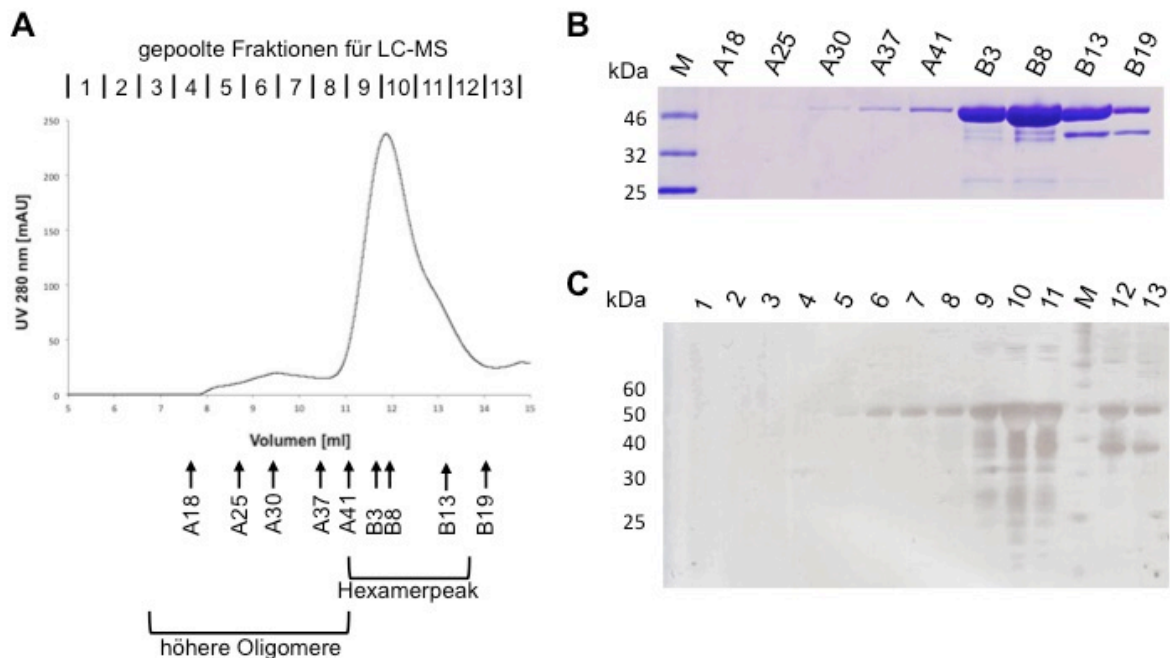
**Abbildung 3.2: Reinigung von DegPSA aus JB48 (*degP dsbA*)**

Die Reinigung des Proteins DegPSA aus der Deletionsmutante JB48 (*degP dsbA*) wurde über zwei Protino® Ni-TED 2000-Säulen vorgenommen. Die Abbildung zeigt die SDS-PAGE-Analyse der Proben, die bei der Produktion und nach jedem Reinigungsschritt entnommen wurden. Aufgetragen wurden die Proben: (A) vl (vor Induktion), nl (nach Induktion mit 100  $\mu$ M IPTG), sowie ein Größenstandard (M) und (B) A (Auftrag), D (Durchfluss), W (Waschschritt mit LEW-Puffer), W5 (Waschschritt mit LEW-Puffer, 5 mM Imidazol), E150 (Elution mit LEW-Puffer, 150 mM Imidazol) und E250 (Elution mit LEW-Puffer, 250 mM Imidazol), sowie ein Größenstandard (M).

Für die Bearbeitung der Fragestellung, welche Proteine unter Stressbedingungen an dem gereinigten Protein gebunden sind, wurde auf eine weitere Reinigung des Proteins verzichtet. Bei den Verunreinigungen, die in Abbildung 3.2 zu erkennen sind, könnte es sich um an die inaktive Serinprotease DegPSA gebundene

potentielle Substrate handeln, die unter den Bedingungen der SDS-PAGE-Analyse aufgetrennt werden.

Im Falle von DegPSA aus JB48 wurden im Anschluss an die Reinigung die Elutionsfraktionen alle vereinigt und dann als Ganzes auf eine Säule zur Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) aufgetragen (Abbildung 3.3 (A)). Dadurch sollten ungebundene Verunreinigungen von den gebundenen potentiellen Substraten getrennt werden. Bei der SEC werden zunächst große Proteine eluiert, während kleinere in die Poren der Matrix eindringen und erst bei höherem Puffervolumen von der Säule eluieren. Von den Fraktionen der SEC wurden einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.3 (A und B)).



**Abbildung 3.3: Vorbereitung von DegPSA aus JB48 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die vereinigten Elutionsfraktionen der DegPSA-Reinigung aus JB48 wurden mittels einer Größenausschlusschromatographie (SEC) mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels Orbitrap Elite Instrument, gekoppelt an ein EASY-nLC 1000 Flüssigchromatographie (LC) System mit einer Nanospray Flex-Ion Ionenquelle (LC-MS) angegeben. Ab Fraktion A1 der SEC bis zur Fraktion B23 wurden jeweils fünf Fraktionen vereinigt (1-13). Bei diesen Fraktionen handelt es sich um alle Fraktionen mit Proteinen oder Proteinkomplexen größer oder gleicher Größe des DegPSA-Hexamers. (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 1-4 wurden je 20 µl, Proben 5-8 je 10 µl und Proben 9-13 je 5 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

Dadurch konnte festgestellt werden, in welchen Fraktionen DegPSA vorhanden war und dass es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem Elutionsvolumen von 12 ml um DegPSA handelt. Bei diesem *Peak* handelte es sich höchstwahrscheinlich um DegPSA-Hexamere, da rechnerisch bei einem Volumen von 11,5 ml Komplexe mit einem Molekulargewicht von 288 kDa (DegPSA-Hexamer) von der Säule eluiert werden (Berechnung nach Kalibrierung, Daten nicht gezeigt). Diese Fraktionen und Komplexe höherer Oligomere waren für die Aufgabenstellung dieser Arbeit interessant und wurden aus diesem Grund für die weiteren massenspektrometrischen Analysen ausgewählt. Um die Anzahl der einzelnen Proben zu reduzieren, wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.3 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion besteht somit aus den SEC-Fraktionen A1-A5, die zweite aus den SEC-Fraktionen A6-A10 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 13, die die vereinigten SEC-Fraktionen B19-B23 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen, da in Abbildung 3.3 (B) schon ersichtlich war, dass in den Fraktionen sehr unterschiedliche Proteinmengen enthalten sind. Von den Proben 1-4 wurden demnach 20 µl, den Proben 5-8 je 10 µl und den Proben 9-13 je 5 µl auf das SDS-Gel geladen (Abbildung 3.3 (C)). Neben dem Protein DegPSA bei etwa 48 kDa sind noch einige potentielle Substrate zu erkennen, die mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse im Anschluss identifiziert werden sollen.

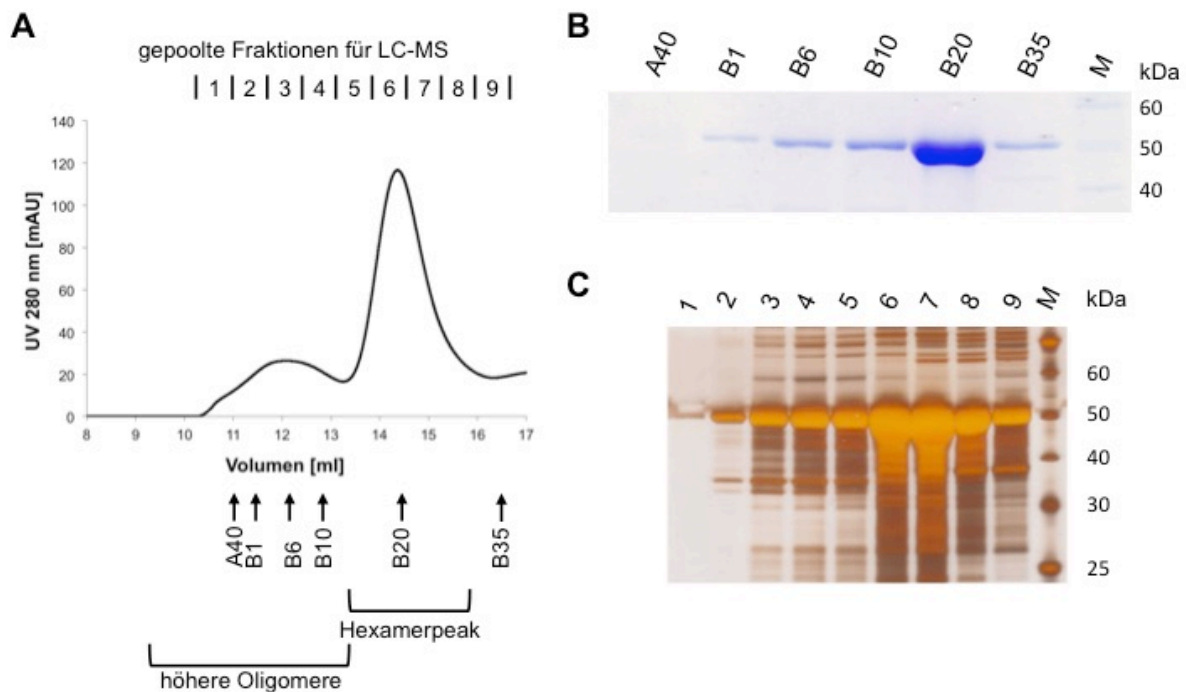
### 3.2.1.2 Proteinreinigung von DegPSA aus JB48 unter SDS/EDTA-Stress

Es sollte eine weitere DegPSA-Reinigung aus JB48 durchgeführt werden, allerdings sollte in diesem Fall das Stressmedium 0,5 mM EDTA und 0,5 % SDS enthalten. Nach der Proteinproduktionszeit von den 1,5 h war keine OD<sub>600</sub> mehr messbar. Es wurden im Anschluss kürzere Produktionszeiten ausgetestet, doch selbst nach 15 min im Stressmedium war die OD<sub>600</sub> so stark gesunken, dass eine Reinigung unter diesen Bedingungen ausgeschlossen wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Reinigungen von Proteinen aus der Deletionsmutante JB55 (Tabelle 3.1) wurde dementsprechend ebenfalls verworfen.

### 3.2.1.3 Proteinreinigung von DegPSA aus JB53

Für die Proteinreinigung wurde rekombinantes DegPSA in *E. coli* JB53-Zellen (*degP* *tsp*) unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl) überproduziert. Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.1.1 beschrieben.



**Abbildung 3.4: Vorbereitung von DegPSA aus JB53 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die vereinigten Elutionsfraktionen der DegPSA-Reinigung aus JB53 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Ab Fraktion A35 der SEC bis zur Fraktion B37 wurden jeweils fünf Fraktionen vereinigt (1-9). Bei diesen Fraktionen handelt es sich um alle Fraktionen mit Proteinen oder Proteinkomplexen größer oder gleicher Größe des DegPSA-Hexamers. (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 1-4 wurden je 20 µl, Proben 5-9 je 10 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

Im Anschluss an die Reinigung wurden bei DegPSA aus JB53 die Elutionsfraktionen (150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol) vereinigt und dann als Ganzes auf eine Säule zur SEC aufgetragen (Abbildung 3.4 (A)). Dadurch sollten ungebundene Verunreinigungen von den gebundenen potentiellen Substraten getrennt werden. Von den Fraktionen der SEC wurden einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.4 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden, in welchen Fraktionen DegPSA vorhanden war und dass es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem

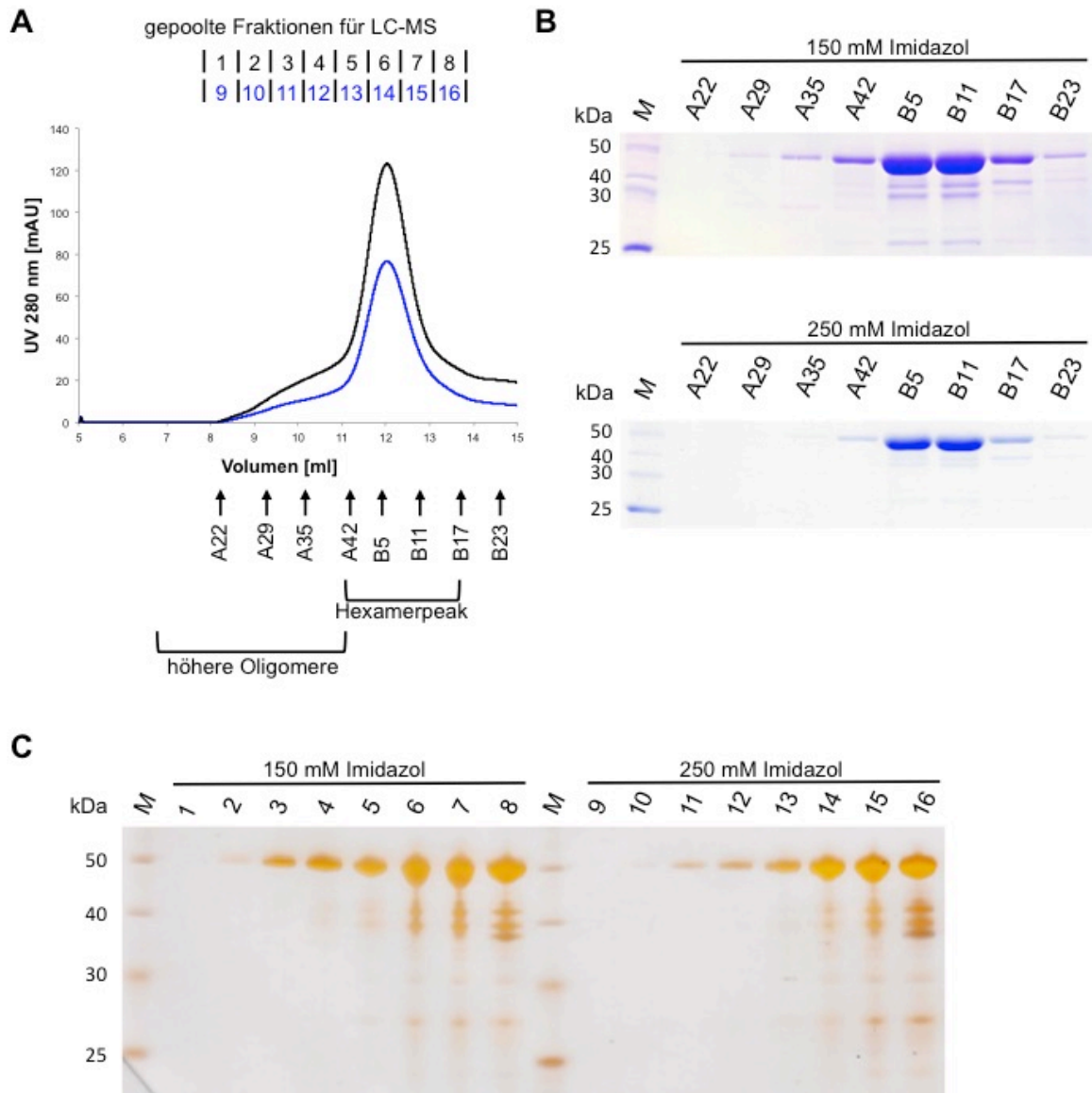
Elutionsvolumen von 14,5 ml um DegPSA handelt. Bei diesem *Peak* handelte es sich höchstwahrscheinlich um DegPSA-Hexamere, auch wenn das Elutionsvolumen im Gegensatz zu der DegPSA-Reinigung aus JB48 (3.2.1.1) abweicht. Grund dafür ist vermutlich die immer wieder aufgetretene Stauchung des Säulenmaterials, wodurch eine Berechnung des Molekulargewichts nach der Kalibrierung der Säule mit Proteinen bekannter Größe nicht mehr möglich war, weil sich die Elutionsvolumina der Proteine bei kürzerer Strecke durch das Säulenmaterial verändern.

Die Fraktionen des DegP-Hexamers und Komplexe höherer Oligomere wurden für die weiteren massenspektrometrischen Analysen ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.4 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion besteht aus den SEC-Fraktionen A35-A39, die zweite aus den SEC-Fraktionen A40-B2 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 9, die die vereinigten SEC-Fraktionen B33-B37 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 1-4 wurden demnach 20 µl und von den Proben 5-9 je 10 µl auf das SDS-Gel geladen (Abbildung 3.4 (C)). Neben dem DegPSA-Monomer bei etwa 48 kDa sind noch einige potentielle Substrate zu erkennen, die mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse im Anschluss identifiziert werden sollen.

#### 3.2.1.4 Proteinreinigung von DegPSA aus JB26

Die Reinigung von rekombinantem DegPSA aus *E. coli* JB26-Zellen (*degP ppiD*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.1.1 beschrieben.

Im Anschluss an die Reinigung wurden bei DegPSA aus JB26 die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 200 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.5 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.5 (A und B)).



**Abbildung 3.5: Vorbereitung von DegPSA aus JB26 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der DegPSA-Reinigung aus JB26 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion A20 der SEC bis zur Fraktion B17 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 1-8 und 250 mM Imidazol: 9-16). Bei diesen Fraktionen handelt es sich um alle Fraktionen mit Proteinen oder Proteinkomplexen größer oder gleicher Größe des DegPSA-Hexamers. (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 1 und 9 wurden je 20 µl, von den Proben 2-4, sowie 10-12 jeweils 10 µl, von den Proben 5 und 8, sowie 13 und 16 je 5 µl und von den Proben 6 und 7, sowie 14 und 15 je 2,5 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

Wie in den vorherigen Versuchen konnte DegPSA als Hexamer eluiert werden (3.2.1.1).

Es wurden jeweils fünf SEC-Fractionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fractionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.5 (A und C)). Die erste gepoolte Fraction (1 bei 150 mM Imidazol und 9 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fractionen A20-A24, die zweite aus den SEC-Fractionen A25-A29 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraction 8 bzw. 16, die die vereinigten SEC-Fractionen B13-B17 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 1 und 9 wurden demnach 20 µl, von den Proben 2-4, sowie 10-11 je 10 µl, von den Proben 5 und 8, sowie 13 und 16 je 5 µl und von den Proben 6 und 7, sowie 14 und 15 jeweils 2,5 µl auf das SDS-Gel geladen (Abbildung 3.5 (C)). Neben dem Protein DegPSA bei etwa 48 kDa sind noch einige potentielle Substrate zu erkennen, die mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse im Anschluss identifiziert werden sollen.

### 3.2.1.5 Massenspektrometrische Analysen von DegPSA aus *degP*-Mutanten

Die unter Stressbedingungen aus den Doppel-KO-Stämmen JB26, JB48 und JB53 gereinigten DegPSA-Proteine sollten mittels massenspektrometrischer Analyse durch eine LC-MS analysiert werden (2.4.12.1). Die potentiell gebundenen und somit mitgereinigten Substrate sollen neue Erkenntnisse über das Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli* geben.

Bei der Auswertung wurden alle als *carry over* ersichtlichen Proteine ausgeschlossen. Nach ersten Vorauswertungen wurden die Ergebnisse aller gepoolten SEC-Fractionen für beide Elutionsfraktionen pro Reinigung zusammengefasst. Bei der Reinigung von DegPSA aus JB26 wurden Peptide von insgesamt 36 zusätzlichen Proteinen durch die LC-MS gefunden. Die Reinigung von DegPSA aus JB48 lieferte Peptide die 57 Proteinen zugeordnet werden konnten. Die meisten potentiellen Substrate wurden bei der Messung von DegPSA aus JB53 mit 90 Proteinen gefunden.

Von diesen Proteinen wurden die 20 nach *MS/MS Count* am häufigsten gefundenen Proteine ausgewählt und nach ihrem Auftreten in den drei unterschiedlichen Reinigungen sortiert. Angegeben ist im Folgenden der zugehörige Genname statt des Proteins.



**Tabelle 3.2: Die 20 häufigsten Ergebnisse der LC-MS-Analyse der DegPSA-Reinigungen aus den Doppel-KO-Stämmen**

Dargestellt sind die zusammengefassten und gekürzten Ergebnisse der LC-MS-Analysen der DegPSA-Reinigungen aus den Deletionsmutanten JB26, JB48 und JB53. Es wurden die 20 nach *MS/MS Count* am häufigsten gefundenen Proteine nach ihrem Vorkommen in den drei Reinigungen sortiert. Die rot hinterlegten potentiellen Substrate kamen bei allen drei Reinigungen vor, die gelb hinterlegten in zwei Reinigungen und die weißen in nur einer der drei Reinigungen. Zusätzlich konnten Faltungshelfer gefunden werden (grau hinterlegt), die zunächst nicht zu den 20 häufigsten Ergebnissen gezählt aber nicht vernachlässigt werden sollen.

Proteinname	Genname	Masse (kDa)	UniProt
Outer membrane protein C	<i>ompC</i>	40,368	P06996
Outer membrane protein A	<i>ompA</i>	37,201	P0A910
LPS-assembly protein LptD	<i>lptD</i>	89,671	P31554
Outer membrane protein assembly factor BamA	<i>bamA</i>	90,553	P0A940
Periplasmic oligopeptide-binding protein	<i>oppA</i>	60,899	P23843
Periplasmic dipeptide transport protein	<i>dppA</i>	60,294	P23847
Putative outer membrane porin protein NmpC	<i>nmpC</i>	40,302	P77747
Glucose-1-phosphatase	<i>agp</i>	45,683	P19926
Outer membrane protein X	<i>ompX</i>	18,603	P0A917
Periplasmic pH-dependent serine endoprotease DegQ	<i>degQ</i>	47,205	P39099
Outer membrane protein F	<i>ompF</i>	39,333	P02931
Maltoporin	<i>lamB</i>	49,912	P02943
Formate dehydrogenase-O major subunit	<i>fdoG</i>	112,549	P32176
Ferrichrome-iron receptor	<i>fhuA</i>	82,182	P06971
Glucans biosynthesis protein G	<i>opgG</i>	57,912	P33136
Vitamin B12 transporter BtuB	<i>btuB</i>	68,407	P06129
Uncharacterized lipoprotein YfhM	<i>yfhM</i>	181,585	P76578
Periplasmic trehalase	<i>treA</i>	63,637	P13482
Outer membrane protein TolC	<i>tolC</i>	53,741	P02930
Protein YdgA	<i>ydgA</i>	54,689	P77804
Soluble lytic murein transglycosylase	<i>slt</i>	73,353	P0AGC3
Thiol:disulfide interchange protein DsbA	<i>dsbA</i>	23,105	P0AEG4
Serine endoprotease DegS	<i>degS</i>	37,581	P0AEE3
Tail-specific protease	<i>prc</i>	76,663	P23865
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	<i>ppiD</i>	68,15	P0ADY1

In allen drei Reinigungen wurden mit absteigender Häufigkeit die Proteine der zugehörigen Gene *ompC*, *ompA*, *lptD*, *bamA*, *oppA*, *dppA*, *nmpC*, *agp*, *ompX* und *ompX* gefunden. In zwei Reinigungen wurde *ompF*, *lamB* und *fdoG* gefunden und in nur noch einer Reinigung *fhuA*, *opgG*, *btuB*, *yfhM*, *treA*, *tolC*, *ydgA* und *slt*. Zusätzlich wurden in diesen *MS/MS Count*-Bereichen weitere Faltungshelfer wie *degQ*, *dsbA*, *degS*, *prc* und *ppiD* gefunden, die jedoch zunächst nicht zu den Top20 der potentiellen Substrate gezählt wurden.

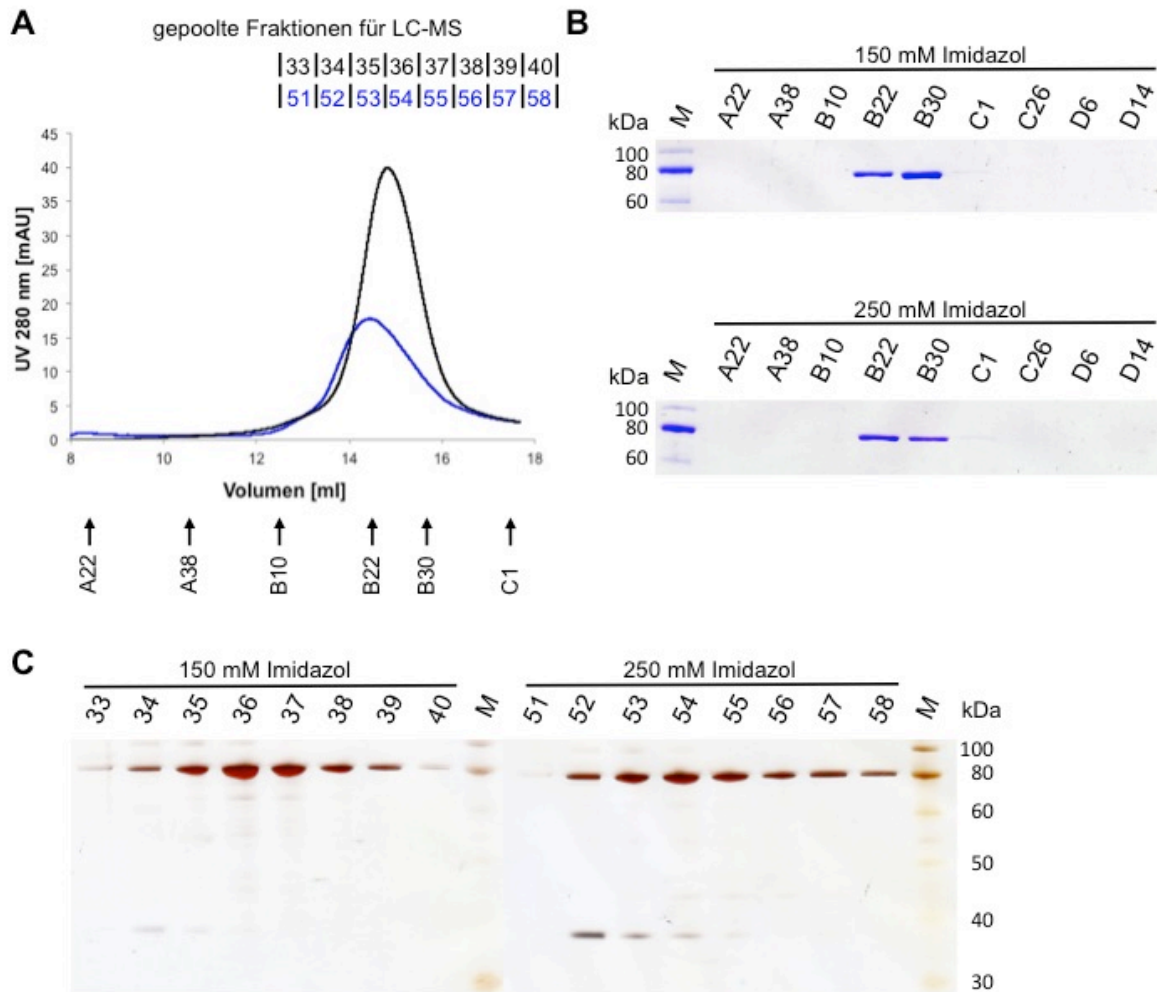
### 3.2.2 PrcSA aus JB53

#### 3.2.2.1 Proteinreinigung von PrcSA aus JB53

Die Reinigung von rekombinantem PrcSA aus *E. coli* JB53-Zellen (*degP tsp*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl). Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Reinigung des Proteins durch einen His-Tag mittels Affinitätschromatographie über eine Protino® Ni-TED 2000-Säule (2.4.2). Der Erfolg der Reinigung wurde kontrolliert indem nach den jeweiligen Reinigungsschritten 10 µl Probe abgenommen wurden. Diese Proben wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (2.4.5) und anschließender Coomassie-Färbung (2.4.6) analysiert. Das gereinigte Protein zeigt in einem SDS-Gel eine elektrophoretische Auftrennung, die seinem theoretischen Molekulargewicht von etwa 78 kDa entspricht.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 200 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.6 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.6 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden in welchen Fraktionen PrcSA vorhanden war und, dass es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem Elutionsvolumen von 15 ml um das 78 kDa große PrcSA handelt.

Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen B9 bis C6 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.6 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion (33 bei 150 mM Imidazol und 51 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen B9-B13, die zweite aus den SEC-Fraktionen B14-B18 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 40 bzw. 58, die die vereinigten SEC-Fraktionen C2-C6 enthält.



**Abbildung 3.6: Vorbereitung von PrcSA aus JB53 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der PrcSA-Reinigung aus JB53 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion B9 der SEC bis zur Fraktion C6 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 33-40 und 250 mM Imidazol: 51-58). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. In allen Fraktionen ist PrcSA enthalten. Von den Proben 33 und 51 wurden je 20 µl, von den Proben 34, 39 und 40, sowie 52, 57 und 58 wurden jeweils 10 µl und von den Proben 35-38, sowie 53-46 je 5 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 33, sowie 51 wurden 20 µl aufgetragen, von den Proben 34, 39 und 40, sowie 52, 57 und 58 je 10 µl, von den Proben 35-38, sowie 53-56 je 5 µl (Abbildung 3.6 (C)). Neben dem Protein PrcSA bei etwa 78 kDa sind nur wenige potentielle Substrate zu erkennen.

### 3.2.2.2 Massenspektrometrische Analyse von PrcSA aus JB53

Das unter Stressbedingungen aus dem Doppel-KO-Stamm JB53 gereinigte PrcSA-Protein sollte im Anschluss an die SEC mittels massenspektrometrischer Analyse durch eine LC-MS analysiert werden (2.4.12.1).

**Tabelle 3.3: Die 20 häufigsten Ergebnisse der LC-MS-Analyse der PrcSA-Reinigung aus JB53**

Dargestellt sind die 20 nach *MS/MS Count* am häufigsten gefundenen potentiellen Substrate der LC-MS-Analysen der PrcSA-Reinigung aus der Deletionsmutante JB53. Zusätzlich konnten Faltungshelfer gefunden werden (grau hinterlegt), die zunächst nicht zu den 20 häufigsten Ergebnissen gezählt aber nicht vernachlässigt werden sollen.

Proteinname	Gencode	Masse (kDa)	UniProt
Glucans biosynthesis protein G	<i>opgG</i>	57,912	P33136
Outer membrane protein A	<i>ompA</i>	37,201	P0A910
Protein YdgH	<i>ydgH</i>	33,903	P76177
Major outer membrane lipoprotein Lpp	<i>lpp</i>	8,323	P69776
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiB	<i>amiB</i>	47,985	P26365
Probable L,D-transpeptidase YbiS	<i>ybiS</i>	33,325	P0AAX8
Probable lipoprotein YiaD	<i>yiaD</i>	22,197	P37665
Inhibitor of vertebrate lysozyme	<i>ivy</i>	16,872	P0AD59
Formate dehydrogenase-O major subunit	<i>fdoG</i>	112,549	P32176
Murein hydrolase activator NlpD	<i>nlpD</i>	40,149	P0ADA3
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiC	<i>amiC</i>	45,634	P63883
Blue copper oxidase CueO	<i>cueO</i>	56,556	P36649
Outer membrane protein C	<i>ompC</i>	40,368	P06996
Protein TolB	<i>tolB</i>	45,956	P0A855
Uncharacterized protein YhhA	<i>yhhA</i>	16,624	P0ADX7
Osmotically-inducible protein Y	<i>osmY</i>	21,074	P0AFH8
Cytochrome c-552	<i>nrfA</i>	53,703	P0ABK9
Periplasmic protein CpxP	<i>cpxP</i>	18,965	P0AE85
Lipopolysaccharide export system protein LptA	<i>lptA</i>	20,127	P0ADV1
Outer membrane protein X	<i>ompX</i>	18,603	P0A917
Chaperone protein Skp (Seventeen kilodalton protein)	<i>skp</i>	17,688	P0AEU7
Periplasmic chaperone Spy (Spheroplast protein Y)	<i>spy</i>	18,199	P77754
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkpA	<i>fkpA</i>	28,882	P45523

Die potentiell gebundenen und somit mitgereinigten Substrate sollen neue Erkenntnisse über das Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli* geben.

Alle als *carry over* ersichtlichen Proteine wurden bei der Auswertung ausgeschlossen. Nach ersten Vorauswertungen wurden die Ergebnisse aller gepoolten SEC-Fractionen für beide Elutionsfraktionen pro Reinigung zusammengefasst. Insgesamt wurden Peptide die 28 zusätzlichen Proteinen zugeordnet werden konnten durch die LC-MS gefunden. Von diesen Proteinen wurden die 20 nach *MS/MS Count* am

häufigsten gefundenen Proteine in der Tabelle 3.3 aufgeführt. Angegeben ist im Folgenden der zugehörige Genname statt des Proteins. Mit absteigender Häufigkeit wurden die Proteine der zugehörigen Gene *opgG*, *ompA*, *ydgH*, *lpp*, *amiB*, *ybiS*, *yiaD*, *ivy*, *fdoG*, *nlpD*, *amiC*, *cueO*, *ompC*, *tolB*, *yhhA*, *osmY*, *nrfA*, *cpxP*, *lptA* und *ompX* gefunden. Zusätzlich wurden in diesen *MS/MS Count*-Bereichen weitere Faltungshelfer wie *skp*, *spy* und *fkpA* gefunden, die jedoch zunächst nicht zu den Top20 der potentiellen Substrate gezählt wurden.

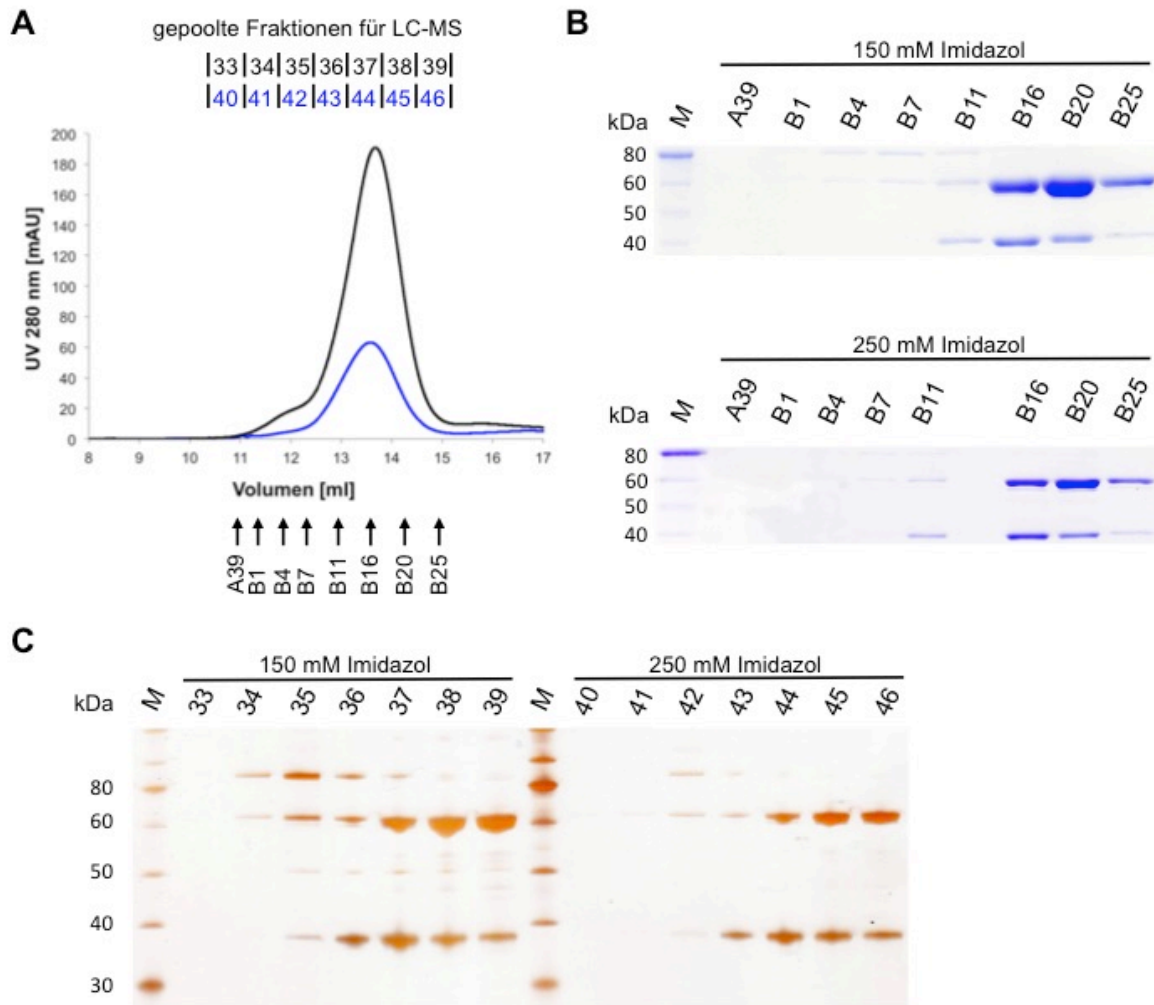
### 3.2.3 PpiD aus JB26

#### 3.2.3.1 Proteinreinigung von PpiD aus JB26

Bei dem gereinigten Protein PpiD handelt es sich nur um die periplasmatische Domäne des Proteins. Im Nachfolgenden wird jedoch der Einfachheit halber der Begriff PpiD genutzt. Die Reinigung des rekombinanten PpiD aus *E. coli* JB26-Zellen (*degP ppiD*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben. Das Protein zeigt in einem SDS-Gel eine elektrophoretische Auftrennung, die seinem theoretischen Molekulargewicht von etwa 67 kDa entspricht.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 200 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.7 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.7 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden in welchen Fraktionen PpiD vorhanden war und dass es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem Elutionsvolumen von 13,5 ml um PpiD handelt.

Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen A35 bis B27 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.7 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion (33 bei 150 mM Imidazol und 40 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen A35-A39, die zweite aus den SEC-Fraktionen A40-B2 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 39 bzw. 46, die die vereinigten SEC-Fraktionen B23-B27 enthält.



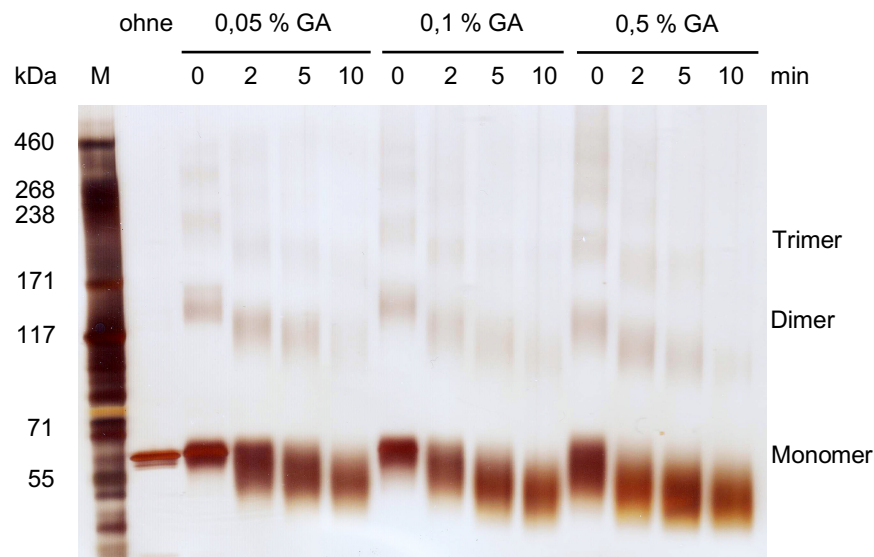
**Abbildung 3.7: Vorbereitung von PpiD aus JB26 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der PpiD-Reinigung aus JB26 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion A35 der SEC bis zur Fraktion B27 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 33-39 und 250 mM Imidazol: 40-46). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 33 und 34, sowie 40 und 41 wurden je 20 µl, von den Proben 35 und 36, sowie 42 und 43 wurden jeweils 10 µl, von den Proben 37 und 38, sowie 44 und 45 wurden jeweils 2,5 µl und von den Proben 39, sowie 46 je 5 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 33 und 34, sowie 40 und 41 wurden je 20 µl auf das SDS-Gel geladen, von den Proben 35 und 36, sowie 42 und 43 je 10 µl, von den Proben 37 und 38, sowie 44 und 45 jeweils 2,5 µl und den Proben 39, sowie 46 je 5 µl (Abbildung 3.7 (C)). Neben dem Protein PpiD bei etwa 67 kDa sind noch

einige potentielle Substrate zu erkennen, die mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse im Anschluss identifiziert werden sollen.

Da die theoretische Größe von PpiD berechnet nach dem Elutionsvolumen durch die Kalibrierung der SEC (Daten nicht gezeigt) ein etwa 2,3-faches Molekulargewicht von etwa 157 kDa ergab, wurde die *Crosslink* Methode (2.4.9) zur Bestimmung oligomerer Zustände eingesetzt.



**Abbildung 3.8: Crosslink der gepoolten Probe 38 von PpiD aus JB26**

Es wurden 3  $\mu$ M der gepoolten Probe PpiD aus JB26 im Reaktionspuffer für 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurde die Probe ohne Glutaraldehyd (GA, 2. Spur) entnommen und die Ansätze mit 0,05 %, 0,1 % und 0,5 % GA versetzt. Es wurden von jedem Ansatz Proben zu den Zeitpunkten 0, 2, 5 und 10 min entnommen und die Reaktion durch die Zugabe von Stopplösung unterbrochen. Nach einer Inkubation von 15 min unter Schütteln (500 rpm) bei Raumtemperatur, folgte eine dreiminütige Inkubation bei 40 °C. Danach wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer und TCEP versetzt und elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss folgte eine Silberfärbung des SDS-Gels. Als Größenstandard (M) wurde der *HiMark Prestained HMW Standard* (Invitrogen) genutzt.

Die Abbildung 3.8 zeigt, dass PpiD oligomere Zustände aufweist. In großer Menge konnte das Monomer bei ca. 67 kDa detektiert werden. Aber auch Dimere bei ca. 134 kDa und wenige Trimere bei ca. 201 kDa waren nachweisbar. Mittels spezifischer PpiD-Antikörper wurde im Western-Blot nachgewiesen, dass es sich bei diesen Banden um das Protein PpiD handelt (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.3.2 Massenspektrometrische Analyse von PpiD aus JB26

Das unter Stressbedingungen aus dem Doppel-KO-Stamm JB26 gereinigte PpiD-Protein wurde im Anschluss an die SEC mittels massenspektrometrischer Analyse durch eine LC-MS analysiert (2.4.12.1). Die potentiell gebundenen und somit

mitgereinigten Substrate sollen neue Erkenntnisse über das Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli* geben.

**Tabelle 3.4: Die Ergebnisse der LC-MS-Analyse der PpiD-Reinigung aus JB26**

Dargestellt sind die Ergebnisse der LC-MS-Analysen der PpiD-Reinigung aus der Deletionsmutante JB26. Die potentiellen Substrate sind dabei absteigend nach ihrer Häufigkeit nach *MS/MS Count* aufgeführt. Die gefundenen Faltungshelfer (grau hinterlegt), sind nach absteigender *MS/MS Count* am Ende der Tabelle aufgeführt.

Proteinname	Genname	Masse (kDa)	UniProt
Periplasmic nitrate reductase	<i>napA</i>	93,042	P33937
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiB	<i>amiB</i>	47,985	P26365
Major outer membrane lipoprotein Lpp	<i>lpp</i>	8,323	P69776
Uncharacterized protease YdcP	<i>ydcP</i>	72,702	P76104
Glucans biosynthesis protein D	<i>opgG</i>	62,758	P33136
Thiol:disulfide interchange protein DsbA	<i>dsbA</i>	23,105	P0AEG4
Periplasmic chaperone Spy (Spheroplast protein Y)	<i>spy</i>	18,199	P77754
Tail-specific protease	<i>prc</i>	76,663	P23865
Chaperone SurA	<i>surA</i>	47,284	P0ABZ6
Chaperone protein Skp (Seventeen kilodalton protein)	<i>skp</i>	17,688	P0AEU7
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkpA	<i>fkpA</i>	28,882	P45523

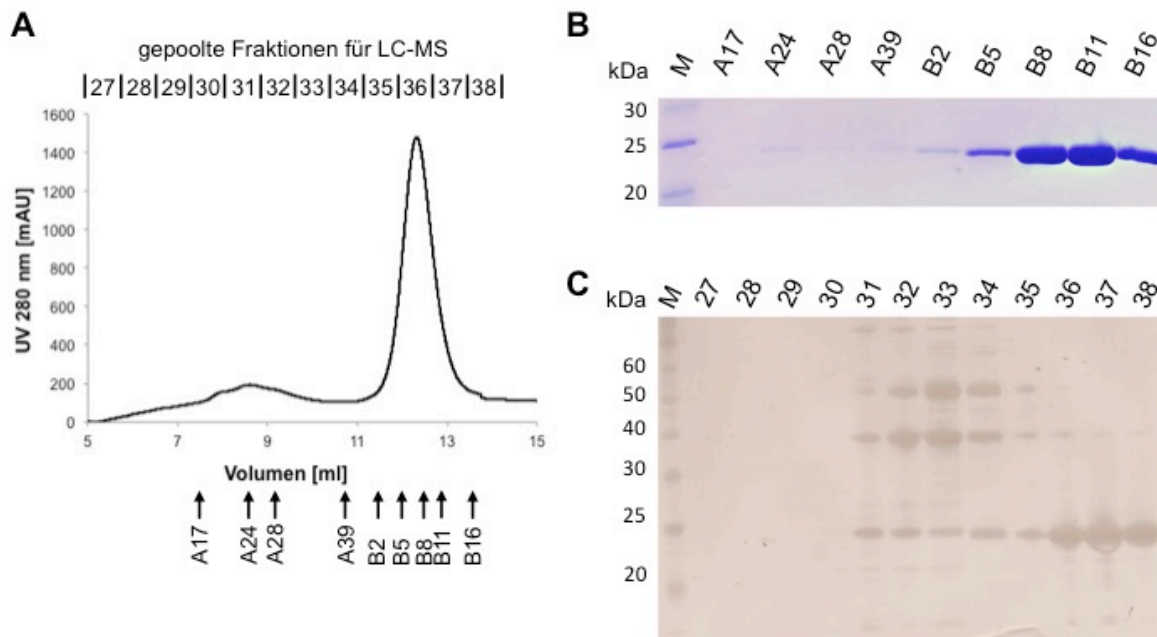
Alle als *carry over* ersichtlichen Proteine wurden bei der Auswertung ausgeschlossen. Nach ersten Vorauswertungen wurden die Ergebnisse aller gepoolten SEC-Fractionen für beide Elutionsfraktionen pro Reinigung zusammengefasst. Insgesamt wurden Peptide die 11 potentiellen Substraten zugeordnet werden konnten durch die LC-MS gefunden (Tabelle 3.4). Angegeben ist im Folgenden der zugehörige Genname statt des Proteins. Mit absteigender Häufigkeit wurden die Proteine der zugehörigen Gene *napA*, *amiB*, *lpp*, *ydcP* und *opgG* gefunden. Zusätzlich wurden in diesen *MS/MS Count*-Bereichen weitere Faltungshelfer wie *dsbA*, *spy*, *prc*, *surA*, *skp* und *fkpA* gefunden.

### 3.2.4 DsbA und DsbAPT aus *dsbA*-Mutanten

#### 3.2.4.1 Proteinreinigung von DsbA aus JB48

Für die Proteinreinigung wurde rekombinantes DsbA in *E. coli* JB48-Zellen (*degP dsbA*) unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl) überproduziert. Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben. Das isolierte Protein zeigt in der SDS-PAGE eine elektrophoretische Auftrennung gemäß seines theoretischen Molekulargewichts von etwa 22 kDa.





**Abbildung 3.9: Vorbereitung von DsbA aus JB48 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die vereinigten Elutionsfraktionen der DsbA-Reinigung aus JB48 wurden mittels SEC mit einer Superdex 75 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Ab Fraktion A1 der SEC bis zur Fraktion B18 wurden jeweils fünf Fraktionen vereinigt (27-38). Bei diesen Fraktionen handelt es sich um alle Fraktionen mit Proteinen oder Proteinkomplexen größer oder gleicher Größe des DsbA-Proteins. (C) Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 27-29 wurden je 20 µl, von den Proben 30-32 je 5 µl, von den Proben 33 und 34 je 10 µl und von den Proben 35-38 je 2 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

Im Anschluss an die Reinigung wurden bei DsbA aus JB48 die Elutionsfraktionen (150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol) vereinigt und dann als Ganzes auf die Säule Superdex 75 10/300 zur SEC aufgetragen (Abbildung 3.9 (A)). Dadurch sollten ungebundene Verunreinigungen von den gebundenen potentiellen Substraten getrennt werden. Von den Fraktionen der SEC wurden einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.9 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden in welchen Fraktionen DsbA vorhanden war. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.9 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion (27) besteht aus den SEC-Fraktionen A1-A5, die zweite aus den SEC-Fraktionen A6-A10 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 38, die die vereinigten SEC-Fraktionen B14-B18 enthält. Für die SDS-PAGE mit an-

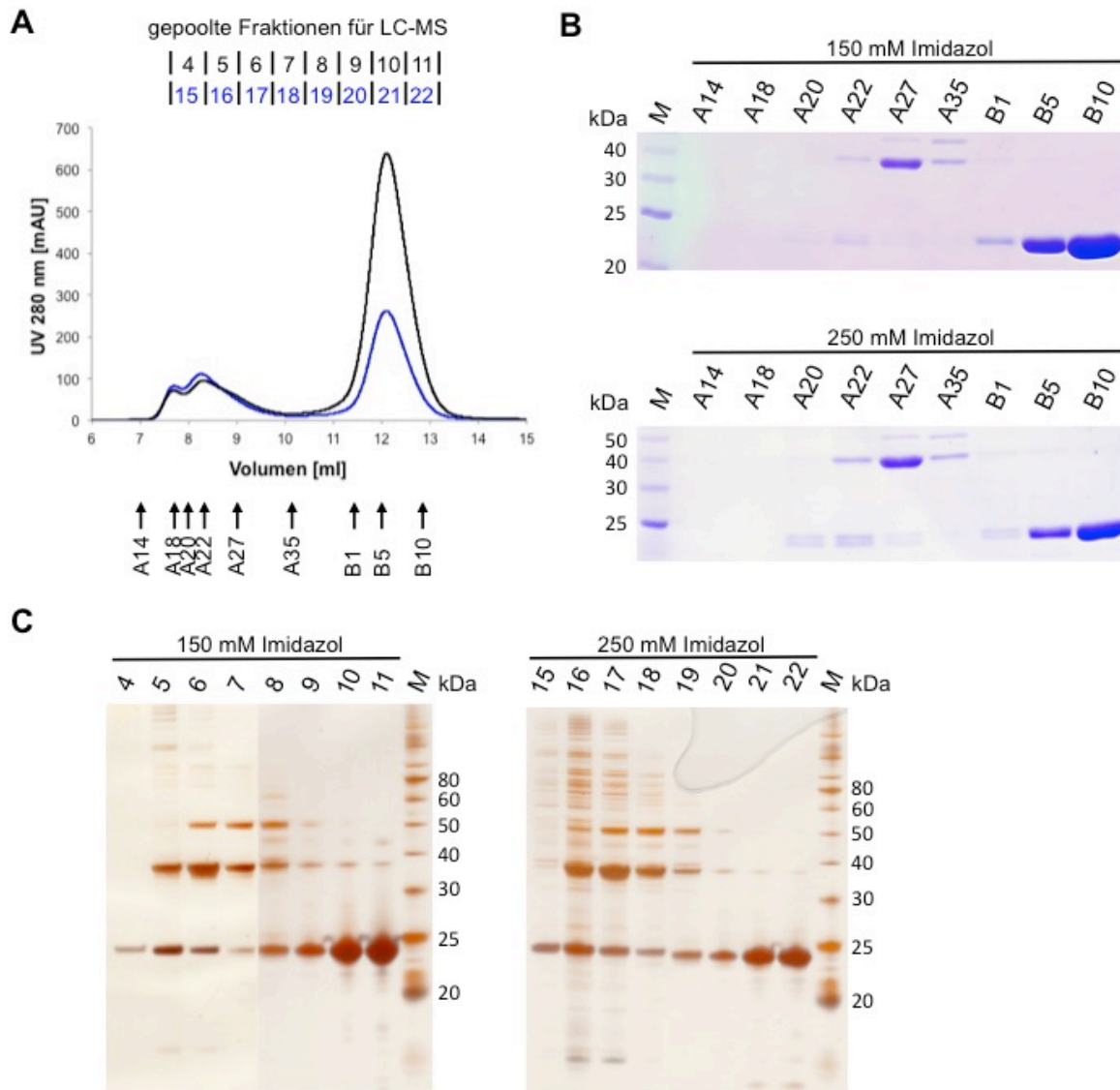
schließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 27-29 wurden demnach 20 µl, von den Proben 30-32 je 5 µl, von den Proben 33 und 34 je 10 µl und von den Proben 35-38 je 2 µl auf das SDS-Gel geladen (Abbildung 3.9 (C)). Neben dem Protein DsbA bei etwa 22 kDa sind noch einige potentielle Substrate zu erkennen, die mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse im Anschluss identifiziert werden sollen.

#### 3.2.4.2 Proteinreinigung von DsbA aus JB60

Eine weitere DsbA-Reinigung erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (Vollmedium bei 42 °C) aus *E. coli* JB60-Zellen (*surA dsbA*). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 75 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.10 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.10 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden in welchen Fraktionen DsbA vorhanden war und dass es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem Elutionsvolumen von 12 ml um das 22 kDa große DsbA handelt. Auch in dem kleineren *Peak* bei dem Elutionsvolumen von etwa 8 ml konnte DsbA nachgewiesen werden.

Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen A16 bis B13 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.10 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion (4 bei 150 mM Imidazol und 15 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen A16-A20, die zweite aus den SEC-Fraktionen A21-A25 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 11 bzw. 22, die die vereinigten SEC-Fraktionen B9-B13 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von der Probe 4 wurden 20 µl auf das SDS-Gel geladen, von den Proben 5-8, sowie 15-19 je 10 µl und von den Proben 9-11, sowie 20-22 je 5 µl (Abbildung 3.10 (C)).



**Abbildung 3.10: Vorbereitung von DsbA aus JB60 zur massenspektrometrischen Analyse**

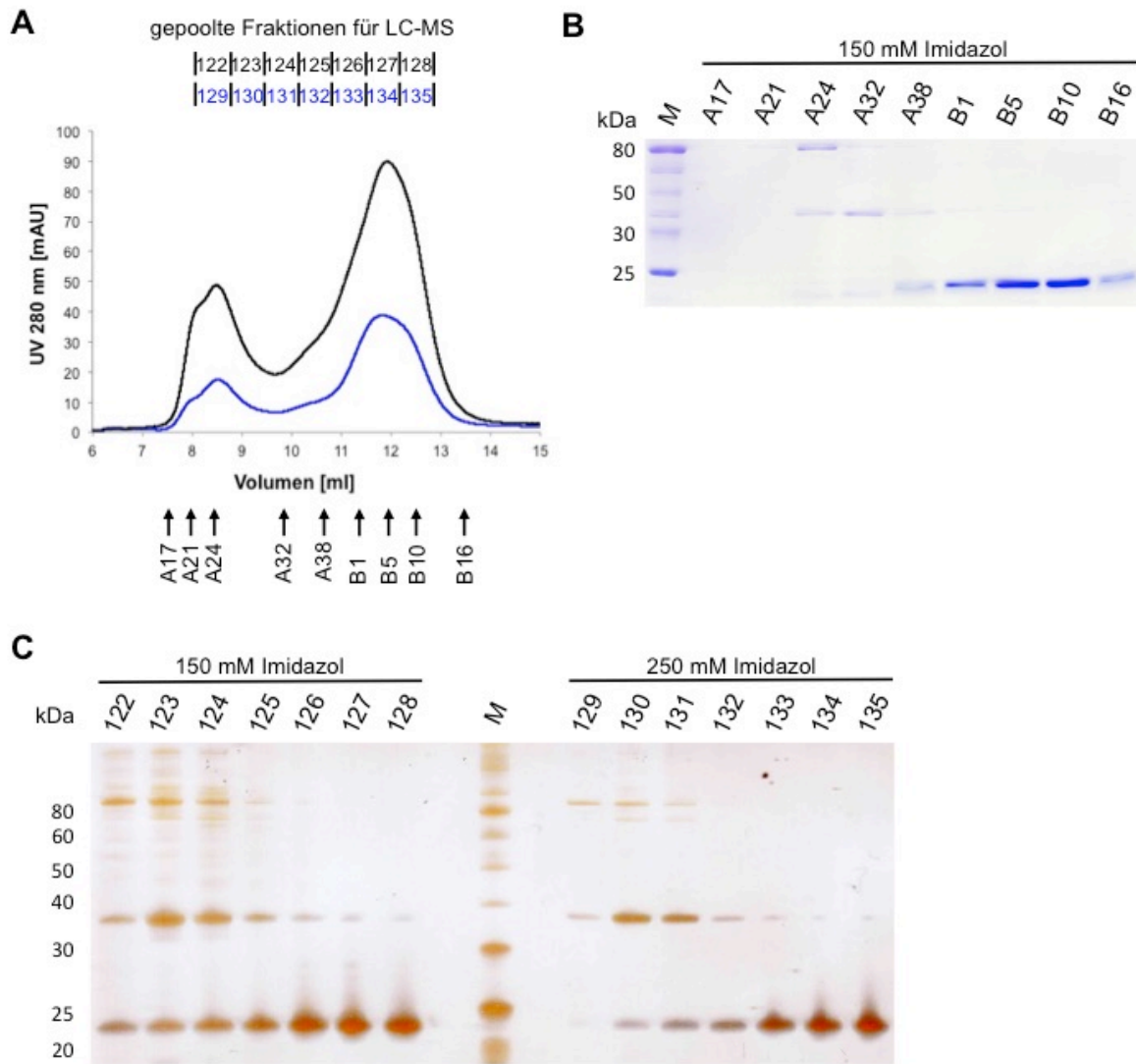
(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der DsbA-Reinigung aus JB60 wurden mittels SEC mit einer Superdex 75 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion A16 der SEC bis zur Fraktion B13 wurden immer fünf Fraktionen gereinigt (150 mM Imidazol: 4-11 und 250 mM Imidazol: 15-22). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von der Probe 4 wurden 20 µl, von den Proben 5-8, sowie 15-19 wurden jeweils 10 µl und von den Proben 9-11, sowie 20-22 wurden jeweils 5 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

### 3.2.4.3 Proteinreinigung von DsbAPT aus JB48

Neben den rekombinanten Proteinen DsbA sollte noch eine inaktive Mutante DsbAPT gereinigt werden. Bei dieser Mutante ist das Prolin an Position 151 zu einem Threonin mutiert, wodurch die Mutante zwar Substrate binden, aber nicht umsetzen kann. Die DsbA-Reinigung aus *E. coli* JB48-Zellen (*degP dsbA*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 75 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.11 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.11 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden, in welchen Fraktionen DsbAPT vorhanden war und, dass es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem Elutionsvolumen von 12 ml um das 22 kDa große DsbAPT handelt. Auch in dem kleineren *Peak* bei dem Elutionsvolumen von etwa 8,5 ml konnte DsbAPT nachgewiesen werden.

Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen A20 bis B12 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.11 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion (122 bei 150 mM Imidazol und 129 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen A20-A24, die zweite aus den SEC-Fraktionen A25-A29 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 128 bzw. 135, die die vereinigten SEC-Fraktionen B8-B12 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 122-124, sowie 129-131 wurden je 10 µl auf das SDS-Gel geladen, von den Proben 125 und 126, sowie 132 und 133 je 5 µl und von den Proben 127 und 128, sowie 134 und 135 jeweils 2,5 µl (Abbildung 3.11 (C)).



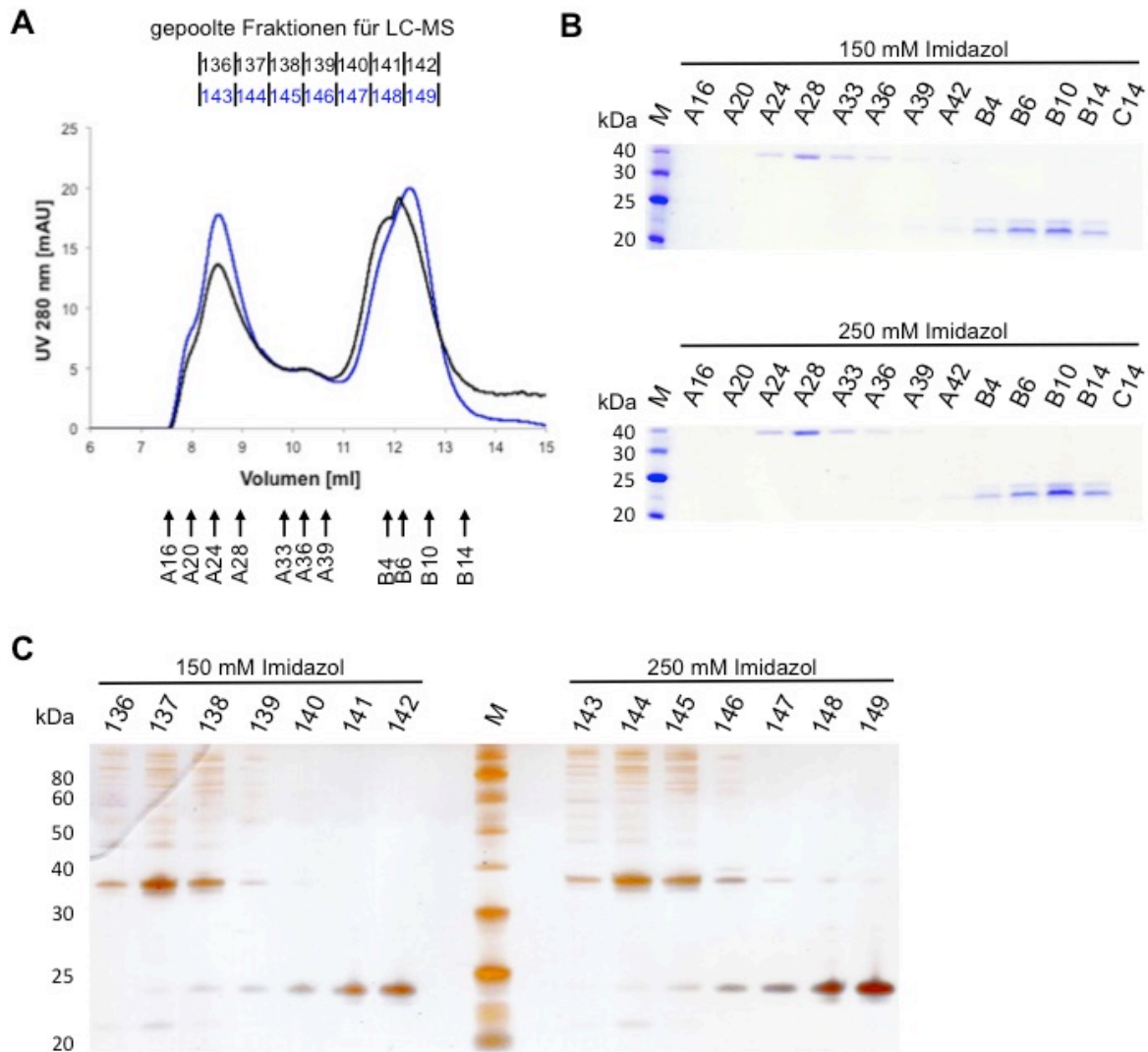
**Abbildung 3.11: Vorbereitung von DsbAPT aus JB48 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der DsbAPT-Reinigung aus JB48 wurden mittels SEC mit einer Superdex 75 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10  $\mu$ l aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion A20 der SEC bis zur Fraktion B12 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 122-128 und 250 mM Imidazol: 129-135). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 122-124, sowie 129-131 wurden jeweils 10  $\mu$ l, von den Proben 125 und 126, sowie 132 und 133 wurden je 5  $\mu$ l und von den Proben 127 und 128, sowie 134 und 135 wurden jeweils 2,5  $\mu$ l aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

#### 3.2.4.4 Proteinreinigung von DsbAPT aus JB60

Die inaktive Mutante DsbAPT wurde ebenfalls aus *E. coli* JB60-Zellen (*surA dsbA*) nach Überproduktion unter Stressbedingungen (Vollmedium 42 °C) gereinigt. Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 75 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.12 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.12 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden in welchen Fraktionen DsbAPT vorhanden war und dass es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem Elutionsvolumen von 12 ml um das 22 kDa große DsbAPT handelt. Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen A20 bis B12 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.12 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion (136 bei 150 mM Imidazol und 143 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen A20-A24, die zweite aus den SEC-Fraktionen A25-A29 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 142 bzw. 149, die die vereinigten SEC-Fraktionen B8-B12 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 136-138, sowie 143-145 wurden je 10 µl auf das SDS-Gel geladen, von den Proben 139 und 140, sowie 146 und 147 je 5 µl, von den Proben 141 und 142, sowie 148 und 149 jeweils 2,5 µl (Abbildung 3.12 (C)).



**Abbildung 3.12: Vorbereitung von DsbAPT aus JB60 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der DsbAPT-Reinigung aus JB60 wurden mittels SEC mit einer Superdex 75 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion A20 der SEC bis zur Fraktion B12 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 136-142 und 250 mM Imidazol: 143-149). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 136-138, sowie 143-145 wurden jeweils 10 µl, von den Proben 139 und 140, sowie 146 und 147 wurden je 5 µl und von den Proben 141 und 142, sowie 148 und 149 wurden jeweils 2,5 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

### 3.2.4.5 Massenspektrometrische Analysen von DsbA/DsbAPT aus *dsbA*-Doppelmutanten

Die unter Stressbedingungen aus den Doppel-KO-Stämmen JB48 und JB60 gereinigten DsbA- und DsbAPT-Proteine sollten mittels massenspektrometrischer Analyse durch eine LC-MS analysiert werden (2.4.12.1). Die potentiell gebundenen

und somit mitgereinigten Substrate sollen neue Erkenntnisse über das Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli* geben.

**Tabelle 3.5: Die 20 häufigsten Ergebnisse der LC-MS-Analyse der DsbA/DsbAPT-Reinigungen aus den Doppel-KO-Stämmen**

Dargestellt sind die zusammengefassten und gekürzten Ergebnisse der LC-MS-Analysen der DsbA/DsbAPT-Reinigungen aus den Deletionsmutanten JB48 und JB60. Es wurden die 20 nach *MS/MS Count* am häufigsten gefundenen Proteine nach ihrem Vorkommen in den vier Reinigungen sortiert. Die rot hinterlegten potentiellen Substrate kamen bei allen vier Reinigungen vor, die gelb hinterlegten in drei Reinigungen, die grün hinterlegten in zwei Reinigungen und die weißen in nur einer der vier Reinigungen. Zusätzlich konnten Faltungshelfer gefunden werden (grau hinterlegt), die zunächst nicht zu den 20 häufigsten Ergebnissen gezählt aber nicht vernachlässigt werden sollen. Die blauen Gennamen bedeuten, dass das zugehörige Protein mindestens eine Disulfidbrücke aufweist.

Proteinname	Genname	Masse (kDa)	UniProt
Outer membrane protein A	<i>ompA</i>	37,201	P0A910
Formate dehydrogenase-O major subunit	<i>fdoG</i>	112,549	P32176
Multidrug efflux pump subunit AcrA	<i>acrA</i>	42,197	P0AE06
Major outer membrane lipoprotein Lpp	<i>lpp</i>	8,323	P69776
Periplasmic chaperone Spy (Spheroplast protein Y)	<i>spy</i>	18,199	P77754
Outer membrane protein C	<i>ompC</i>	40,368	P06996
D-methionine-binding lipoprotein MetQ	<i>metQ</i>	29,432	P28635
Glucans biosynthesis protein G	<i>opgG</i>	57,912	P33136
Periplasmic nitrate reductase	<i>napA</i>	93,042	P33937
Outer membrane protein assembly factor BamA	<i>bamA</i>	90,553	P0A940
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacA	<i>dacA</i>	44,444	P0AEB2
Uncharacterized protein YhhA	<i>yhhA</i>	16,624	P0ADX7
Osmotically-inducible protein Y	<i>osmY</i>	21,074	P0AFH8
Protein YdgA	<i>ydgA</i>	54,689	P77804
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiA	<i>amiA</i>	31,412	P36548
Periplasmic serine endoprotease DegP	<i>degP</i>	49,354	P0C0V0
Periplasmic pH-dependent serine endoprotease DegQ	<i>degQ</i>	47,205	P39099
Chaperone protein Skp (Seventeen kilodalton protein)	<i>skp</i>	17,688	P0AEU7
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	<i>ppiD</i>	68,15	P0ADY1
Uncharacterized lipoprotein YbjP	<i>ybjP</i>	18,991	P75818
Protein YdgH	<i>ydgH</i>	33,903	P76177
Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	<i>potD</i>	38,867	P0AFK9
Periplasmic oligopeptide-binding protein	<i>oppA</i>	60,899	P23843
Glycine betaine/proline betaine-binding periplasmic protein	<i>proX</i>	36,023	P0AFM2
Putative acyl-CoA thioester hydrolase YbhC	<i>ybhC</i>	46,082	P46130

Bei der Auswertung wurden alle als *carry over* ersichtlichen Proteine ausgeschlossen. Nach ersten Vorauswertungen wurden die Ergebnisse aller gepoolten SEC-Fraktionen für beide Elutionsfraktionen pro Reinigung zusammengefasst. Bei der Reinigung von DsbA aus JB48 wurden Peptide von insgesamt 74 zusätzlichen Proteinen durch die LC-MS gefunden. Die Reinigung von DsbAPT aus JB48 lieferte Peptide, die 56 Proteinen zugeordnet werden konnten. Bei der Reinigung von DsbA



aus JB60 wurden ebenfalls Peptide von insgesamt 74 potentiellen Substraten gefunden. Die Reinigung von DsbPT aus JB60 lieferte Peptide, die 40 Proteinen zugeordnet werden konnten. Insgesamt wurden 10 potentielle Substrate gefunden, die mindestens eine Disulfidbrücke aufweisen.

Von diesen Proteinen wurden die 20 nach *MS/MS Count* am häufigsten gefundenen Proteine ausgewählt und nach ihrem Auftreten in den vier unterschiedlichen Reinigungen sortiert. Da sich die Ergebnisse der Proteine DsbA und DsbAPT kaum unterschieden, wurden sie zusammen ausgewertet (Tabelle 3.5). Angegeben ist im Folgenden der zugehörige Genname statt des Proteins.

In allen vier Reinigungen wurden mit absteigender Häufigkeit die Proteine der zugehörigen Gene *ompA*, *fdoG*, *acrA* und *lpp* gefunden. In drei Reinigungen wurde *ompC*, *metQ*, *opgG* und *napA* gefunden. Die sechs Proteine mit den zugehörigen Genen *bamA*, *dacA*, *yhhA*, *osmY*, *ydgA* und *amiA* wurden noch in zwei Reinigungen nachgewiesen und in nur noch einer Reinigung *ybjP*, *ydgH*, *potD*, *oppA*, *proX* und *ybhC*. Zusätzlich wurden in diesen *MS/MS Count*-Bereichen weitere Faltungshelfer wie *spy*, *degP* (bei JB60), *degQ*, *skp* und *ppiD* gefunden, die jedoch zunächst nicht zu den Top20 der potentiellen Substrate gezählt wurden. Sechs Proteine dieser 20 häufigsten Proteine weisen Disulfidbrücken auf.

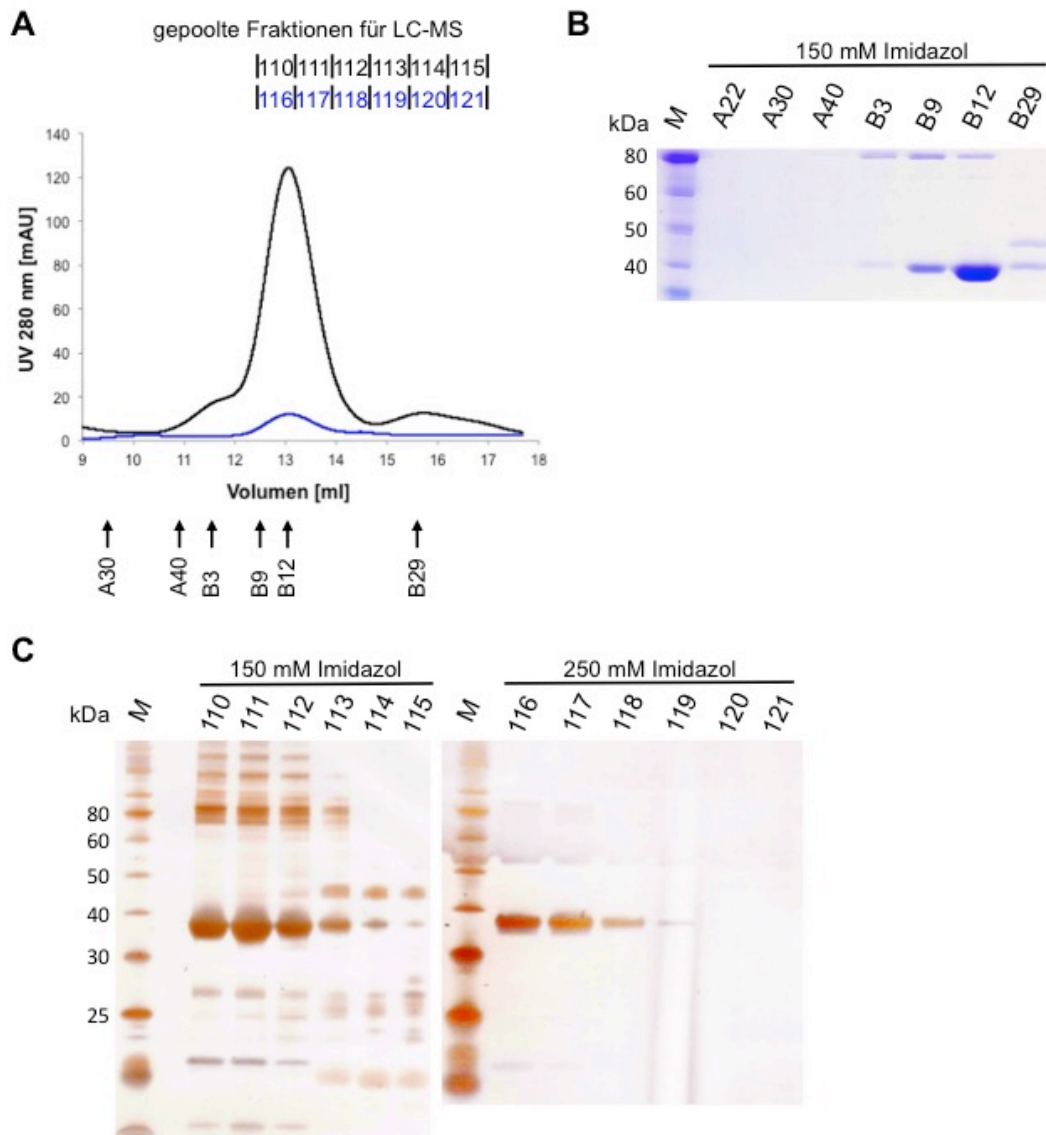
### 3.2.5 SurA aus *surA*-Mutanten

#### 3.2.5.1 Proteinreinigung von SurA aus JB60

Die SurA-Reinigung aus *E. coli* JB60-Zellen (*surA dsbA*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (Vollmedium bei 42 °C). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben. Das Protein zeigt in einem SDS-Gel eine elektrophoretische Auftrennung, die seinem theoretischen Molekulargewicht von etwa 46 kDa entspricht.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 200 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.13 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.13 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden, in welchen Fraktionen SurA vorhanden war und, dass es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem Elutionsvolumen von 13 ml nicht um das 46 kDa große SurA handelt, sondern um das im oligomeren Zustand

vorliegende 37 kDa große LacI (Daten nicht gezeigt). SurA wird hauptsächlich in dem kleinen *Peak* bei einem Volumen von 15-17 ml von der Säule eluiert.



**Abbildung 3.13: Vorbereitung von SurA aus JB60 zur massenspektrometrischen Analyse**

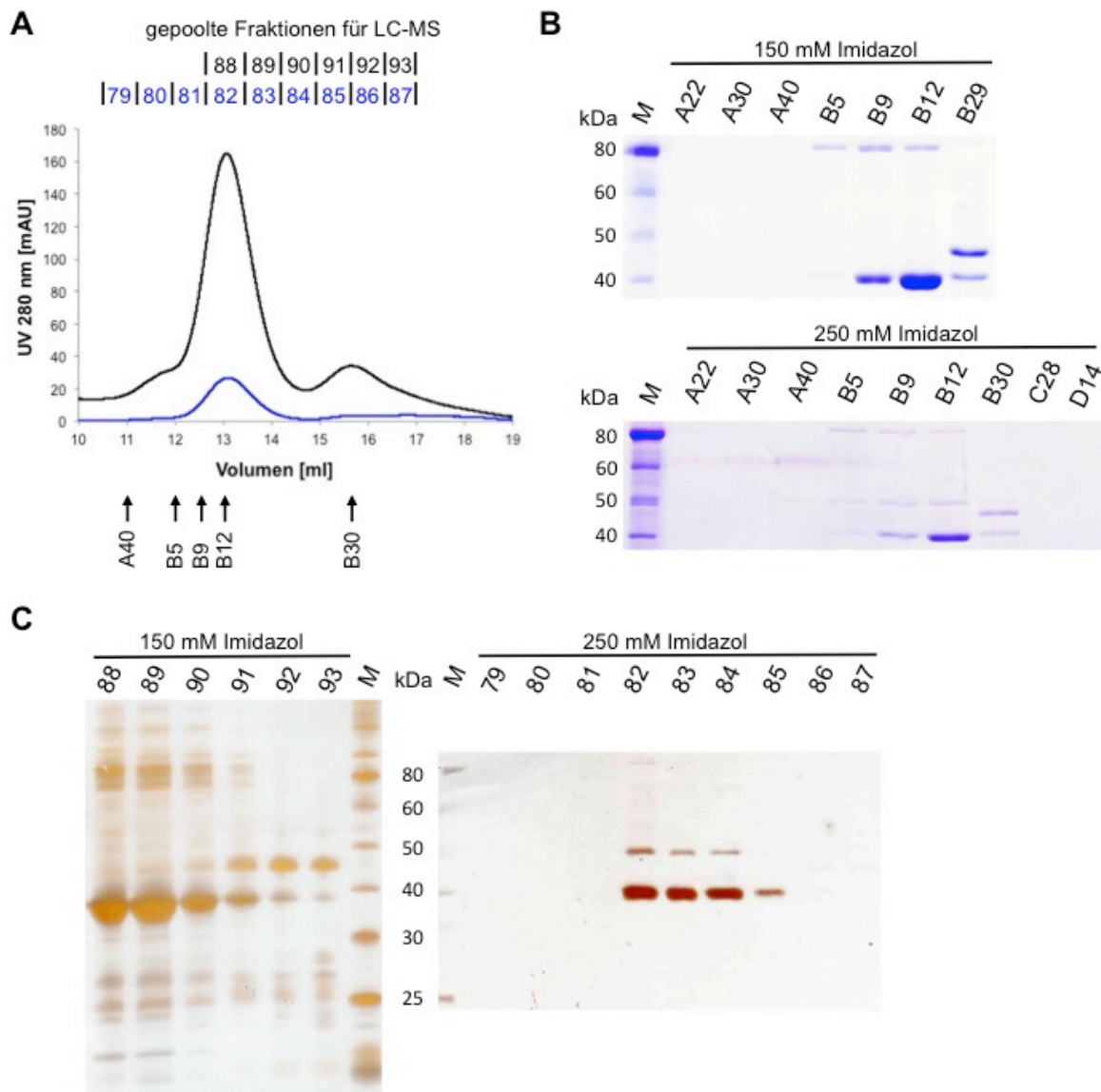
(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der SurA-Reinigung aus JB60 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion B10 der SEC bis zur Fraktion B39 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 110-115 und 250 mM Imidazol: 116-121). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 110-112 wurden jeweils 15 µl, von der Probe 113 10 µl und von den Proben 114 und 115 wurden jeweils 5 µl aufgetragen. Von den Proben 116-121 wurden jeweils 10 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen B10 bis B39 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.13 (**A** und **C**)). Die erste gepoolte Fraktion (110 bei 150 mM Imidazol und 116 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen B10-B14, die zweite aus den SEC-Fraktionen B15-B19 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 115 bzw. 121, die die vereinigten SEC-Fraktionen B35-B39 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 110-112 wurden je 15 µl auf das SDS-Gel geladen, von der Probe 113 10 µl und von den Proben 114 und 115 jeweils 5 µl. Von den Proben 116-121 wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (Abbildung 3.13 (**C**)).

### 3.2.5.2 Proteinreinigung von SurA aus JB65

Die SurA-Reinigung aus *E. coli* JB65-Zellen (*surA yfgC*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 200 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.14 (**A**)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.14 (**A** und **B**)). Dadurch konnte festgestellt werden, in welchen Fraktionen SurA vorhanden war und, dass es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem Elutionsvolumen von 13 ml nicht um das 46 kDa große SurA handelt, sondern um das im oligomeren Zustand vorliegende 37 kDa große Lacl (Daten nicht gezeigt). SurA wird hauptsächlich in dem *Peak* mit geringer UV-Absorbtion bei einem Volumen von 15-17 ml von der Säule eluiert.



**Abbildung 3.14: Vorbereitung von SurA aus JB65 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der SurA-Reinigung aus JB65 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Bei 150 mM Imidazol wurden ab Fraktion B10 der SEC bis zur Fraktion B39 immer fünf Fraktionen vereinigt (88-93). Bei 250 mM Imidazol wurden schon ab Fraktion A35 bis Fraktion B37 immer fünf Fraktionen vereinigt (79-87). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 88 und 89, sowie 79-81 wurden jeweils 15 µl, von den Proben 90, sowie 82-87 wurden jeweils 10 µl, von der Probe 91 5 µl und von den Proben 92 und 93 wurden jeweils 2,5 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen B10 bis B39 vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie die Fraktionen A35 bis B37 bei der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden

jeweils fünf SEC-Fractionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.14 (A und C)). Bei 150 mM Imidazol besteht die erste gepoolte Fraktion 88 aus den SEC-Fractionen B10-B14, die zweite aus den SEC-Fractionen B15-B19 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 93, die die vereinigten SEC-Fractionen B35-B39 enthält. Bei 250 mM Imidazol besteht die erste gepoolte Fraktion 79 aus den SEC-Fractionen A35-A39, die zweite aus den SEC-Fractionen A40-B2 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 87, die die vereinigten SEC-Fractionen B33-B37 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 88 und 89, sowie 79-81 wurden jeweils 15 µl auf das SDS-Gel geladen, von den Proben 90, sowie 82-87 je 10 µl, von der Probe 91 5 µl und von den Proben 92 und 93 jeweils 2,5 µl (Abbildung 3.14 (C)).

Da bei Abbildung 3.14 (B) bei den Proben aus dem Elutionsschritt mit 250 mM Imidazol nur bei der SEC-Fraktion B30 eine Proteinbande auf Höhe der 46 kDa nachgewiesen wurde und bei Abbildung 3.14 (C) die oberen Banden in den gepoolten Fraktionen 82-84 etwas zu hoch, bei einem Molekulargewicht von 50 kDa, laufen, was eher den oberen Banden aus den SEC-Fractionen B9 und B12 (Abbildung 3.14 (B)) entspricht, wurde eine Western Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion der vereinigten Fraktionen 79-87 durchgeführt. Dabei konnte bestimmt werden, dass die Fraktionen 83 bis 87 das Protein SurA enthalten.



**Abbildung 3.15: Western Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion von SurA aus JB65**

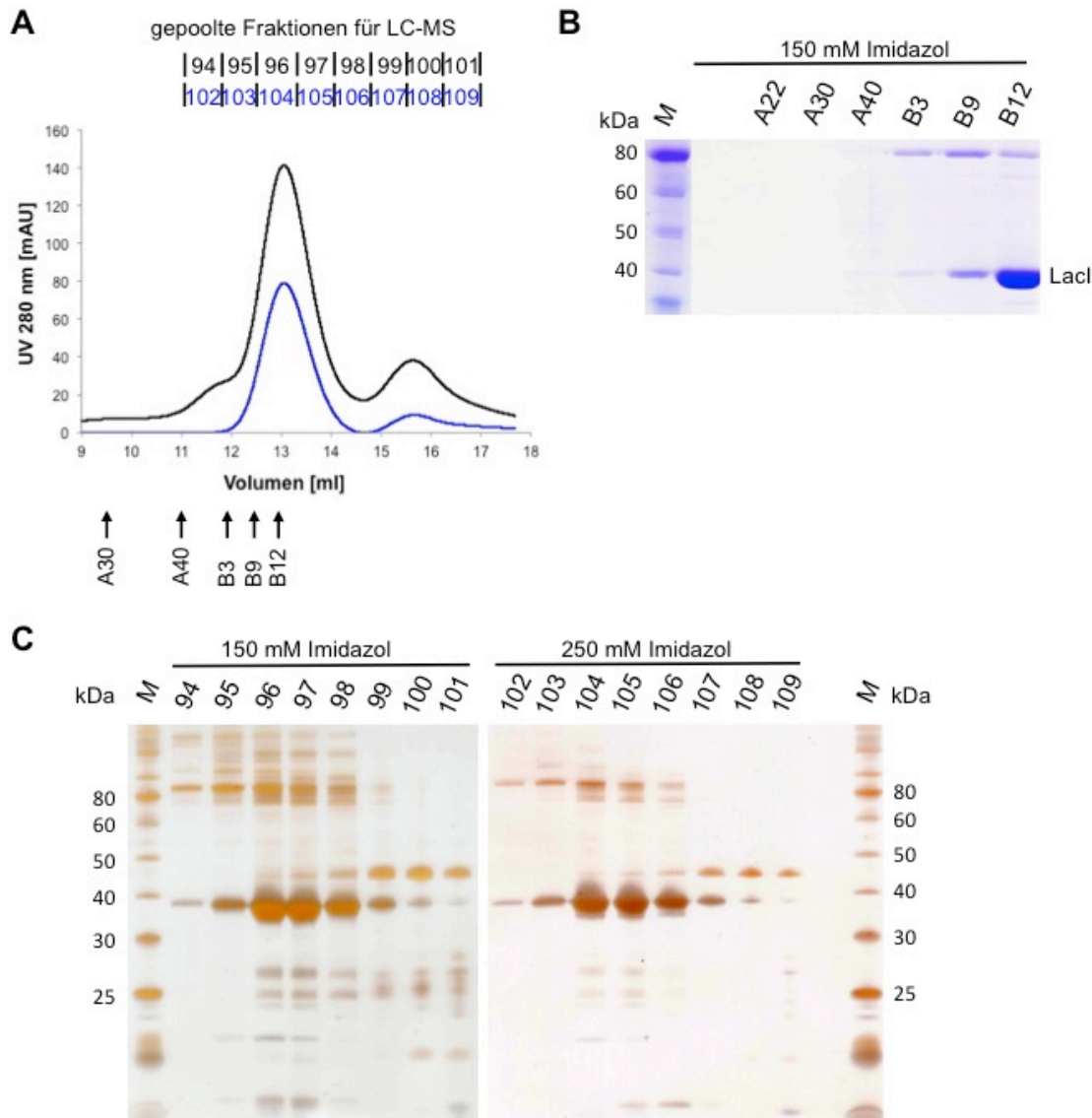
Von den vereinigten Fraktionen 79 bis 87 der SurA-Reinigung aus JB65 (Elution bei 250 mM Imidazol) nach der SEC für die Analyse mittels LC-MS wurden je 10 µl Probe mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Western Blot-Analyse wurde mit anschließender Immundetektion mittels spezifischer SurA-Antikörper durchgeführt. Es wurde zum Abschätzen der Proteingröße ein Größenstandard (M) eingesetzt.

### 3.2.5.3 Proteinreinigung von SurA aus JB63

Die SurA-Reinigung aus *E. coli* JB63-Zellen (*surA ptrA*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 200 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.16 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.16 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden, in welchen Fraktionen SurA vorhanden war und, dass es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem Elutionsvolumen von 13 ml nicht um das 46 kDa große SurA handelt, sondern um das im oligomeren Zustand vorliegende 37 kDa große Lacl (Daten nicht gezeigt). SurA wird hauptsächlich in dem *Peak* mit geringer UV-Absorbtion bei einem Volumen von 15-17 ml von der Säule eluiert.

Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen A42 bis B39 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie mit der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.16 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion (94 bei 150 mM Imidazol und 102 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen A42-B4, die zweite aus den SEC-Fraktionen B5-B9 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 101 bzw. 109, die die vereinigten SEC-Fraktionen B35-B39 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 94-96, sowie 102-104 wurden jeweils 15 µl auf das SDS-Gel geladen, von den Proben 97 und 98, sowie 105 und 106 je 10 µl, von den Proben 99 und 107 je 5 µl und den Proben 100 und 101, sowie 108 und 109 je 2,5 µl (Abbildung 3.16 (C)).



**Abbildung 3.16: Vorbereitung von SurA aus JB63 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der SurA-Reinigung aus JB63 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10  $\mu$ l aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion A42 der SEC bis zur Fraktion B39 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 94-101 und 250 mM Imidazol: 102-109). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 94-96, sowie 102-104 wurden jeweils 15  $\mu$ l, von den Proben 97 und 98, sowie 105 und 106 wurden je 10  $\mu$ l, von den Proben 99 und 107 wurden je 5  $\mu$ l und von den Proben 100 und 101, sowie 108 und 109 wurden jeweils 2,5  $\mu$ l aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

### 3.2.5.4 Massenspektrometrische Analysen von SurA aus *surA*-Doppelmutanten

Die unter Stressbedingungen aus den Doppel-KO-Stämmen JB60, JB63 und JB65 gereinigten SurA-Proteine sollten mittels massenspektrometrischer Analyse durch eine LC-MS analysiert werden (2.4.12.1). Die potentiell gebundenen und somit mitgereinigten Substrate sollen neue Erkenntnisse über das Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli* geben.

**Tabelle 3.6: Die 20 häufigsten Ergebnisse der LC-MS-Analyse der SurA-Reinigungen aus den Doppel-KO-Stämmen**

Dargestellt sind die zusammengefassten und gekürzten Ergebnisse der LC-MS-Analysen der SurA-Reinigungen aus den Deletionsmutanten JB60, JB63 und JB65. Es wurden die 20 nach *MS/MS Count* am häufigsten gefundenen Proteine nach ihrem Vorkommen in den drei Reinigungen sortiert. Die rot hinterlegten potentiellen Substrate kamen bei allen drei Reinigungen vor, die gelb hinterlegten in zwei Reinigungen und die weiß hinterlegten kamen in nur einer der drei Reinigungen vor. Zusätzlich konnten Faltungshelfer gefunden werden (grau hinterlegt), die zunächst nicht zu den 20 häufigsten Ergebnissen gezählt aber nicht vernachlässigt werden sollen.

Proteinname	Gencode	Masse (kDa)	UniProt
Outer membrane protein A	<i>ompA</i>	37,201	P0A910
Periplasmic nitrate reductase	<i>napA</i>	93,042	P33937
Osmotically-inducible protein Y	<i>osmY</i>	21,074	P0AFH8
Uncharacterized protease YdcP	<i>ydcP</i>	72,702	P76104
Blue copper oxidase CueO	<i>cueO</i>	56,556	P36649
Glucans biosynthesis protein D	<i>opgG</i>	57,912	P33136
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiA	<i>amiA</i>	31,412	P36548
Periplasmic chaperone Spy (Spheroplast protein Y)	<i>spy</i>	18,199	P77754
Periplasmic pH-dependent serine endoprotease DegQ	<i>degQ</i>	47,205	P39099
Periplasmic serine endoprotease DegP	<i>degP</i>	49,354	P0C0V0
Serine endoprotease DegS	<i>degS</i>	37,581	P0AEE3
Uncharacterized protein YhhA	<i>yhhA</i>	16,624	P0ADX7
Major outer membrane lipoprotein Lpp	<i>lpp</i>	8,323	P69776
Formate dehydrogenase-O major subunit	<i>fdoG</i>	112,549	P32176
Zinc resistance-associated protein	<i>zraP</i>	15,199	P0AAA9
Chaperone protein Skp (Seventeen kilodalton protein)	<i>skp</i>	17,688	P0AEU7
Inhibitor of vertebrate lysozyme	<i>ivy</i>	16,872	P0AD59
Outer membrane protein assembly factor BamA	<i>bamA</i>	90,553	P0A940
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiC	<i>amiC</i>	45,634	P63883
Outer membrane protein C	<i>ompC</i>	40,368	P06996
Protein TolB	<i>tolB</i>	45,956	P0A855
Probable L,D-transpeptidase YbiS	<i>ybiS</i>	33,325	P0AAX8
Multidrug efflux pump subunit AcrA	<i>acrA</i>	42,197	P0AE06
Antigen 43	<i>flu</i>	106,825	P39180
Probable L,D-transpeptidase YnhG	<i>ynhG</i>	36,082	P76193
Thiol:disulfide interchange protein DsbA	<i>dsbA</i>	23,105	P0AEG4
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	<i>ppiD</i>	68,15	P0ADY1



Bei der Auswertung wurden alle als *carry over* ersichtlichen Proteine ausgeschlossen. Nach ersten Vorauswertungen wurden die Ergebnisse aller gepoolten SEC-Fraktionen für beide Elutionsfraktionen pro Reinigung zusammengefasst. Bei den Reinigungen von SurA aus JB60 und JB65 wurden jeweils Peptide von 14 zusätzlichen Proteinen durch die LC-MS gefunden. Dabei handelte es sich zum Großteil um identische Proteine. Die Reinigung von SurA aus JB63 lieferte Peptide die 27 Proteinen zugeordnet werden konnten.

Von diesen potentiellen Substraten wurden die 20 nach *MS/MS Count* am häufigsten gefundenen Proteine ausgewählt und nach ihrem Auftreten in den drei unterschiedlichen Reinigungen sortiert (Tabelle 3.6). Angegeben ist im Folgenden der zugehörige Genname statt des Proteins.

In allen drei Reinigungen wurden mit absteigender Häufigkeit die Proteine der zugehörigen Gene *ompA*, *napA*, *osmY*, *ydcP*, *cueO*, *opgG* und *amiA* gefunden. In zwei Reinigungen wurde *yhhA*, *lpp*, *fdoG* und *zraP* gefunden und in nur noch einer Reinigung *ivy*, *bamA*, *amiC*, *ompC*, *tolB*, *ybiS*, *acrA*, *flu* und *ynhG*. Zusätzlich wurden in diesen *MS/MS Count*-Bereichen weitere Faltungshelfer wie *spy*, *degQ*, *degP*, *degS*, *skp*, *dsbA* (JB63) und *ppiD* gefunden, die jedoch zunächst nicht zu den Top20 der potentiellen Substrate gezählt wurden.

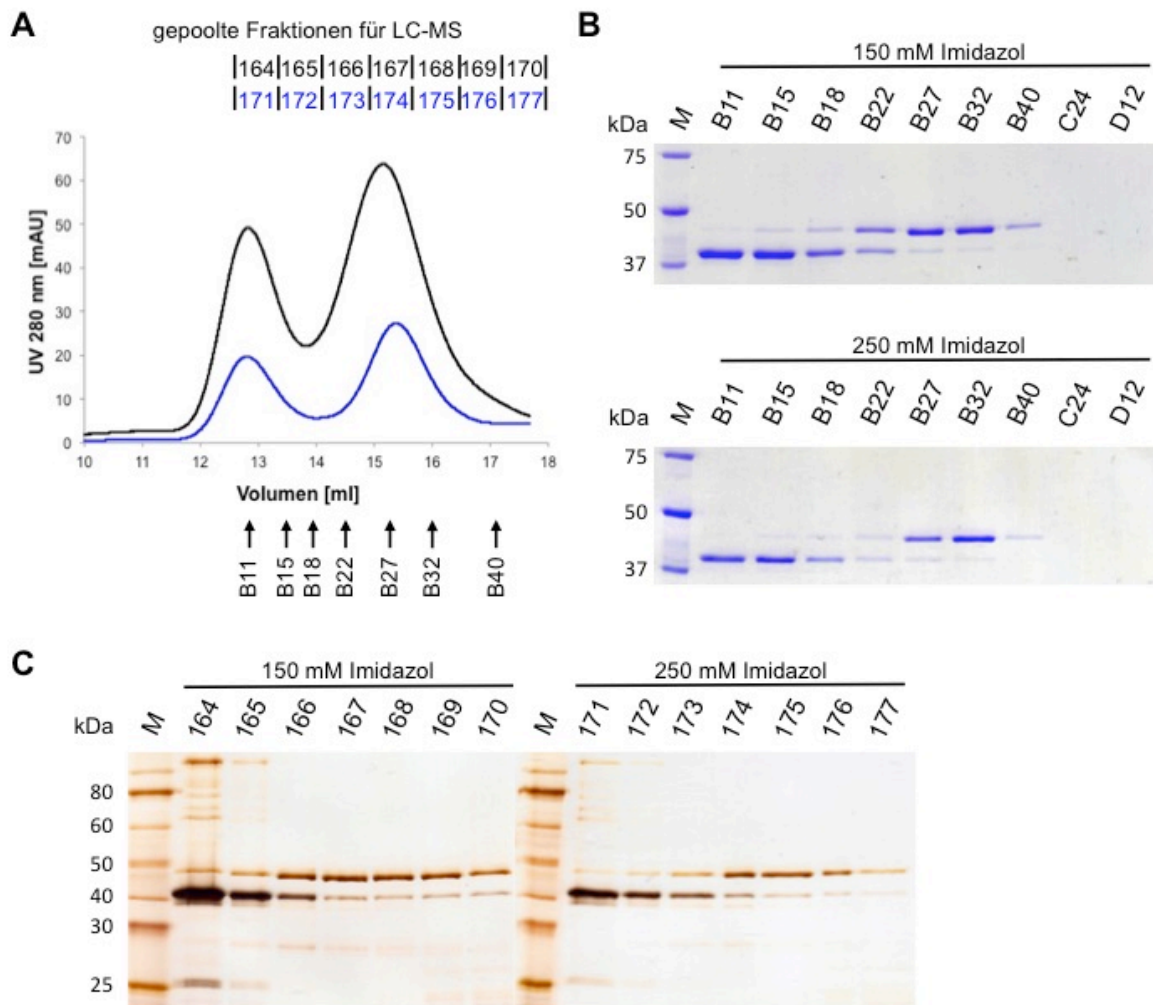
### 3.2.6 BepAEQ aus JB65

#### 3.2.6.1 Proteinreinigung von BepAEQ aus JB65

Die Reinigung des rekombinanten BepAEQ aus *E. coli* JB65-Zellen (*surA yfgC*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.1.1 beschrieben, allerdings über zwei Protino® Ni-TED 150-Säulen. Das theoretische Molekulargewicht von BepAEQ liegt bei 52 kDa. Das Protein zeigt in einem SDS-Gel eine elektrophoretische Auftrennung, die einem Molekulargewicht von etwa 46 kDa entspricht. Dies wurde anhand einer Western Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 200 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.17 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und

anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.17 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden, in welchen Fraktionen BepAEQ vorhanden war und, dass es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem Elutionsvolumen von 15,5 ml um BepAEQ handelt.



**Abbildung 3.17: Vorbereitung von BepAEQ aus JB65 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der BepAEQ-Reinigung aus JB65 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion B10 der SEC bis zur Fraktion C2 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 164-170 und 250 mM Imidazol: 171-177). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 164 und 171 wurden jeweils 20 µl, von den Proben 165 und 170, sowie 172, 173 und 177 jeweils 10 µl, von den Proben 169, sowie 174-176 wurden jeweils 5 µl und von den Proben 167 und 168 wurden jeweils 2,5 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

Bei dem *Peak* mit dem Elutionsvolumen von etwa 13 ml handelt es sich um das im oligomeren Zustand vorliegende Lacl (Daten nicht gezeigt). Dieses ist auch auf den SDS-Gelen auf Höhe von etwa 40 kDa zu erkennen (Abbildung 3.17 (B und C)).

Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen B10 bis C2 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.17 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion (164 bei 150 mM Imidazol und 171 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen B10-B14, die zweite aus den SEC-Fraktionen B15-B19 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 170 bzw. 177, die die vereinigten SEC-Fraktionen B40-C2 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 164, sowie 171 wurden jeweils 20 µl auf das SDS-Gel geladen, von den Proben 165 und 170, sowie 172, 173 und 177 je 10 µl, von den Proben 169, sowie 174-176 je 5 µl und den Proben 167 und 168 je 2,5 µl (Abbildung 3.17 (C)).

### 3.2.6.2 Massenspektrometrische Analyse von BepAEQ aus JB65

Das unter Stressbedingungen aus dem Doppel-KO-Stamm JB65 gereinigte BepAEQ-Protein wurde im Anschluss an die SEC mittels massenspektrometrischer Analyse durch eine LC-MS analysiert (2.4.12.1). Die potentiell gebundenen und somit mitgereinigten Substrate sollen neue Erkenntnisse über das Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli* geben.

Alle als *carry over* ersichtlichen Proteine wurden bei der Auswertung ausgeschlossen. Nach ersten Vorauswertungen wurden die Ergebnisse aller gepoolten SEC-Fraktionen für beide Elutionsfraktionen pro Reinigung zusammengefasst. Insgesamt wurden Peptide die 19 potentiellen Substraten zugeordnet werden konnten durch die LC-MS gefunden (Tabelle 3.7). Angegeben ist im Folgenden der zugehörige Genname statt des Proteins. Mit absteigender Häufigkeit wurden die Proteine der zugehörigen Gene *amiA*, *osmY*, *napA*, *ompA*, *tolB*, *acrA*, *ansB*, *lpp*, *pliG*, *ivy*, *proX*, *zraP* und *osmE* gefunden. Zusätzlich wurden weitere Faltungshelfer wie *dsbA*, *degP*, *spy*, *degS*, *fkpA* und *skp* gefunden.

**Tabelle 3.7: Die Ergebnisse der LC-MS-Analyse der BepAEQ-Reinigung aus JB65**

Dargestellt sind die Ergebnisse der LC-MS-Analysen der BepAEQ-Reinigung aus der Deletionsmutante JB65. Die potentiellen Substrate sind dabei absteigend nach ihrer Häufigkeit nach *MS/MS Count* aufgeführt. Die gefundenen Faltungshelfer (grau hinterlegt), sind nach absteigender *MS/MS Count* am Ende der Tabelle aufgeführt.

Proteinname	Genname	Masse (kDa)	UniProt
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiA	<i>amiA</i>	31,412	P36548
Osmotically-inducible protein Y	<i>osmY</i>	21,074	P0AFH8
Periplasmic nitrate reductase	<i>napA</i>	93,042	P33937
Outer membrane protein A	<i>ompA</i>	37,201	P0A910
Protein TolB	<i>tolB</i>	45,956	P0A855
Multidrug efflux pump subunit AcrA	<i>acrA</i>	42,197	P0AE06
L-asparaginase 2	<i>ansB</i>	36,851	P00805
Major outer membrane lipoprotein Lpp	<i>lpp</i>	8,323	P69776
Inhibitor of g-type lysozyme	<i>pliG</i>	14,906	P76002
Inhibitor of vertebrate lysozyme	<i>ivy</i>	16,872	P0AD59
Glycine betaine/proline betaine-binding periplasmic protein	<i>proX</i>	36,023	P0AFM2
Zinc resistance-associated protein	<i>zraP</i>	15,199	P0AAA9
Osmotically-inducible lipoprotein E	<i>osmE</i>	12,021	P0ADB1
Thiol:disulfide interchange protein DsbA	<i>dsbA</i>	23,105	P0AEG4
Periplasmic serine endoprotease DegP	<i>degP</i>	49,354	P0C0V0
Periplasmic chaperone Spy (Spheroplast protein Y)	<i>spy</i>	18,199	P77754
Serine endoprotease DegS	<i>degS</i>	37,581	P0AEE3
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkpA	<i>fkpA</i>	28,882	P45523
Chaperone protein Skp (Seventeen kilodalton protein)	<i>skp</i>	17,688	P0AEU7

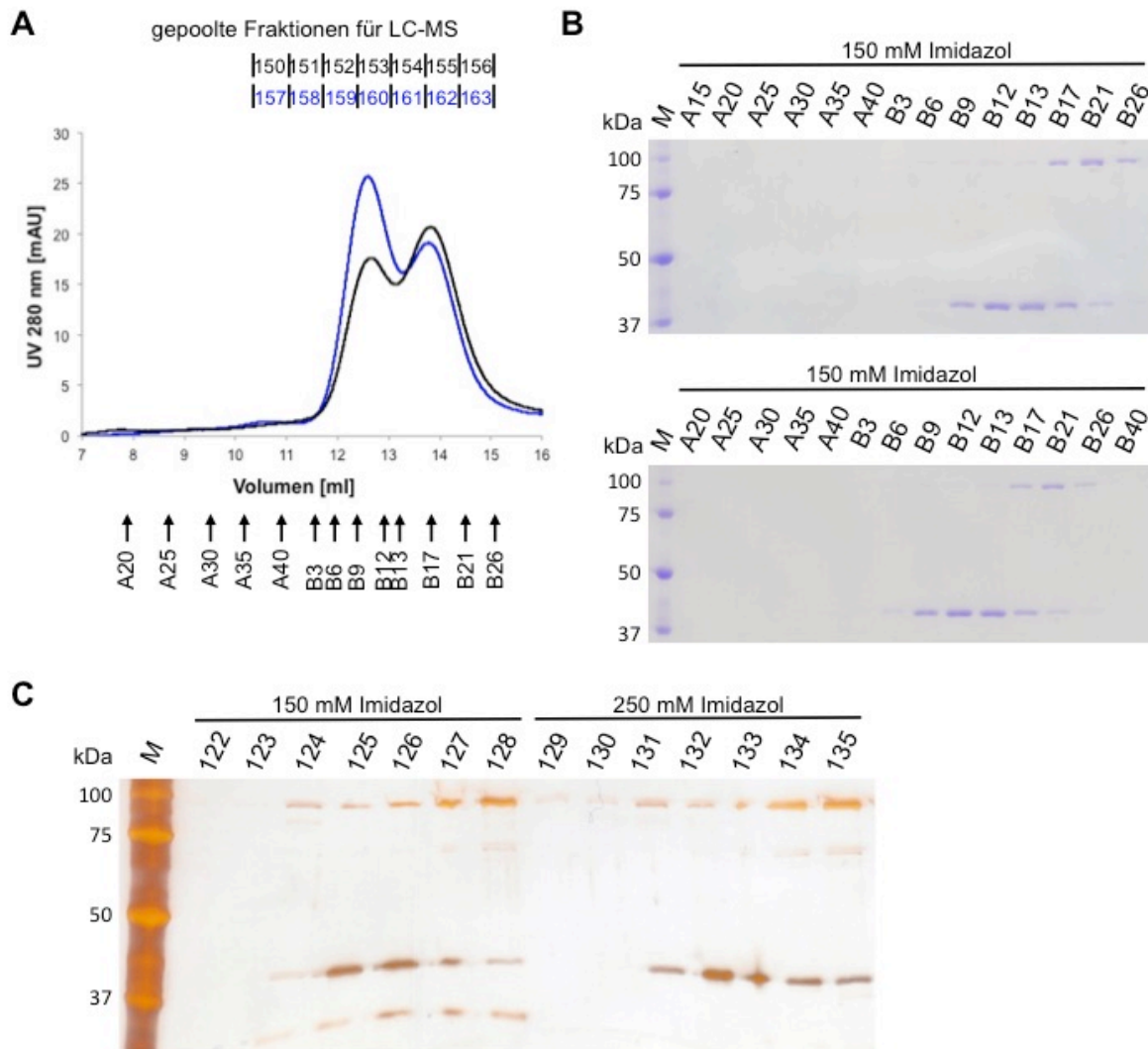
### 3.2.7 PtrAEQ aus JB63

#### 3.2.7.1 Proteinreinigung von PtrAEQ aus JB63

Die Reinigung des rekombinanten PtrAEQ aus *E. coli* JB63-Zellen (*surA ptrA*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben, allerdings über nur eine Protino® Ni-TED 150-Säulen. Das Protein zeigt in einem SDS-Gel eine elektrophoretische Auftrennung, die seinem theoretischen Molekulargewicht von etwa 106 kDa entspricht.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 200 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.18 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.18 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden, in welchen Fraktionen PtrAEQ vorhanden war und, dass

es sich im Chromatogramm der SEC bei dem *Peak* bei dem Elutionsvolumen von etwa 14 ml um PtrAEQ handelt. Bei dem *Peak* mit dem Elutionsvolumen von etwa 12,5 ml handelt es sich um das im oligomeren Zustand vorliegende Lacl (Daten nicht gezeigt). Dieses ist auch auf den SDS-Gelen auf Höhe von etwa 40 kDa zu erkennen (Abbildung 3.18 (B und C)).



**Abbildung 3.18: Vorbereitung von PtrAEQ aus JB63 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der PtrAEQ-Reinigung aus JB63 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10  $\mu$ l aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion A35 der SEC bis zur Fraktion B27 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 150-156 und 250 mM Imidazol: 157-163). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 150, sowie 157 wurden jeweils 5  $\mu$ l, von den Proben 151, 152 und 156, sowie 158, 159 und 163 jeweils 2,5  $\mu$ l und von den Proben 153-155, sowie 160-162 wurde jeweils 1  $\mu$ l aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen A35 bis B27 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.18 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion (150 bei 150 mM Imidazol und 157 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen A35-A39, die zweite aus den SEC-Fraktionen A40-B2 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 156 bzw. 163, die die vereinigten SEC-Fraktionen B23-B27 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 150, sowie 157 wurden jeweils 5 µl auf das SDS-Gel geladen, von den Proben 151, 152 und 156, sowie 158, 159 und 163 je 2,5 µl und von den Proben 153-155, sowie 160-162 je 1 µl (Abbildung 3.18 (C)).

### 3.2.7.2 Massenspektrometrische Analyse von PtrAEQ aus JB63

Das unter Stressbedingungen aus dem Doppel-KO-Stamm JB63 gereinigte PtrAEQ-Protein wurde im Anschluss an die SEC mittels massenspektrometrischer Analyse durch eine LC-MS analysiert (2.4.12.1). Die potentiell gebundenen und somit mitgereinigten Substrate sollen neue Erkenntnisse über das Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli* geben.

**Tabelle 3.8: Die Ergebnisse der LC-MS-Analyse der PtrAEQ-Reinigung aus JB63**

Dargestellt sind die Ergebnisse der LC-MS-Analysen der PtrAEQ-Reinigung aus der Deletionsmutante JB63. Die potentiellen Substrate sind dabei absteigend nach ihrer Häufigkeit nach *MS/MS Count* aufgeführt. Die gefundenen Faltungshelfer (grau hinterlegt), sind nach absteigender *MS/MS Count* am Ende der Tabelle aufgeführt.

Proteinname	Genname	Masse (kDa)	UniProt
Murein DD-endopeptidase MepS/Murein LD-carboxypeptidase	<i>mepS</i>	21,04	P0AFV4
Outer membrane protein A	<i>ompA</i>	37,201	P0A910
Ferrichrome-iron receptor	<i>fhuA</i>	82,182	P06971
LPS-assembly protein LptD	<i>lptD</i>	89,671	P31554
Maltoporin	<i>lamB</i>	49,912	P02943
Outer membrane protein C	<i>ompC</i>	40,368	P06996
Multidrug efflux pump subunit AcrA	<i>acrA</i>	42,197	P0AE06
Major outer membrane lipoprotein Lpp	<i>lpp</i>	8,323	P69776
Uncharacterized protein YdbJ	<i>ydbJ</i>	8,696	P0ACW2
Serine endoprotease DegS	<i>degS</i>	37,581	P0AEE3
Periplasmic serine endoprotease DegP	<i>degP</i>	49,354	P0C0V0
Thiol:disulfide interchange protein DsbA	<i>dsbA</i>	23,105	P0AEG4
Chaperone protein Skp (Seventeen kilodalton protein)	<i>skp</i>	17,688	P0AEU7

Alle als *carry over* ersichtlichen Proteine wurden bei der Auswertung ausgeschlossen. Nach ersten Vorauswertungen wurden die Ergebnisse aller gepoolten SEC-Fractionen für beide Elutionsfraktionen pro Reinigung zusammengefasst. Insgesamt wurden Peptide die 13 potentiellen Substraten zugeordnet werden konnten durch die LC-MS gefunden (Tabelle 3.8). Angegeben ist im Folgenden der zugehörige Genname statt des Proteins. Mit absteigender Häufigkeit wurden die Proteine der zugehörigen Gene *mepS*, *ompA*, *fhuA*, *lptD*, *lamB*, *ompC*, *acrA*, *lpp* und *ydbJ* gefunden. Zusätzlich wurden weitere Faltungshelfer wie *degS*, *degP*, *dsbA* und *skp* gefunden.

### 3.2.8 Überprüfung der Kompensation durch DegQSA aus *degP*-Mutanten

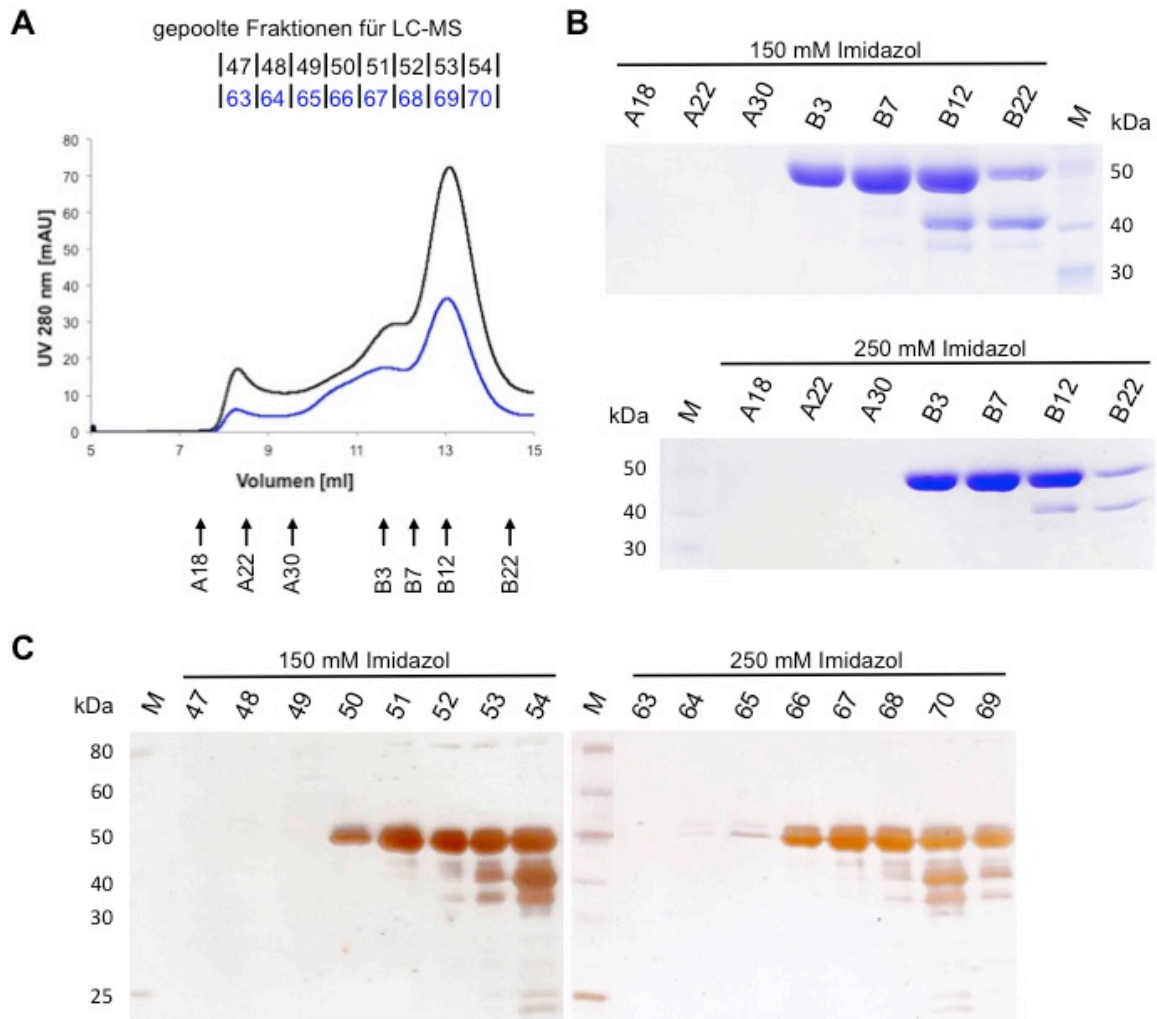
In den vorangegangenen Reinigungen wurde jeweils ein *Knockout* in den Deletionsstämmen durch eine extrachromosomale Überexpression ausgeglichen, die hergestellten Proteine im Anschluss gereinigt und in Bezug auf die gebundenen Substrate massenspektrometrisch analysiert. In den *degP*-Mutanten sollte zusätzlich DegQSA produziert werden, da die periplasmatische Serinprotease DegQ durch eine 58%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz als Homolog zu DegP beschrieben wurde (Bass *et al.*, 1996; Waller und Sauer, 1996). Obwohl die genauen Aufgaben von DegQ bis jetzt ungeklärt sind, wird von einer ähnlichen Funktion wie bei DegP ausgegangen. Durch die Reinigung und anschließende massenspektrometrische Analyse von DegQSA aus den *degP*-*Knockout*-Stämmen soll geklärt werden, ob DegQ und DegP möglicherweise die gleichen Substrate aufweisen und DegQ damit potenziell die Aufgaben von DegP übernehmen kann.

#### 3.2.8.1 Proteinreinigung von DegQSA aus JB48

Die DegQSA-Reinigung aus *E. coli* JB48-Zellen (*degP dsbA*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben. Das theoretische Molekulargewicht von DegQSA liegt bei etwa 45 kDa. Das isolierte Protein zeigt in der SDS-PAGE eine elektrophoretische Auftrennung die etwas höher bei etwa 50 kDa liegt.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 200

10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.19 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.19 (A und B)). Dadurch konnte festgestellt werden, in welchen Fraktionen DegQSA vorhanden war. DegQSA wird in einem Bereich von etwa 11-14 ml eluiert. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um oligomere Zustände von DegQSA, sowie gebundene potentielle Substrate.



**Abbildung 3.19: Vorbereitung von DegQSA aus JB48 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der DegQSA-Reinigung aus JB48 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion A20 der SEC bis zur Fraktion B17 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 47-54 und 250 mM Imidazol: 63-70). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 47-49, sowie 63-65 wurden jeweils 17 µl, von den Proben 50 und 51, sowie 66 wurden je 10 µl, von den Proben 52 und 53, sowie 68 und 69 wurden je 2,5 µl und von den Proben 54, sowie 67 und 70 wurden jeweils 5 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.



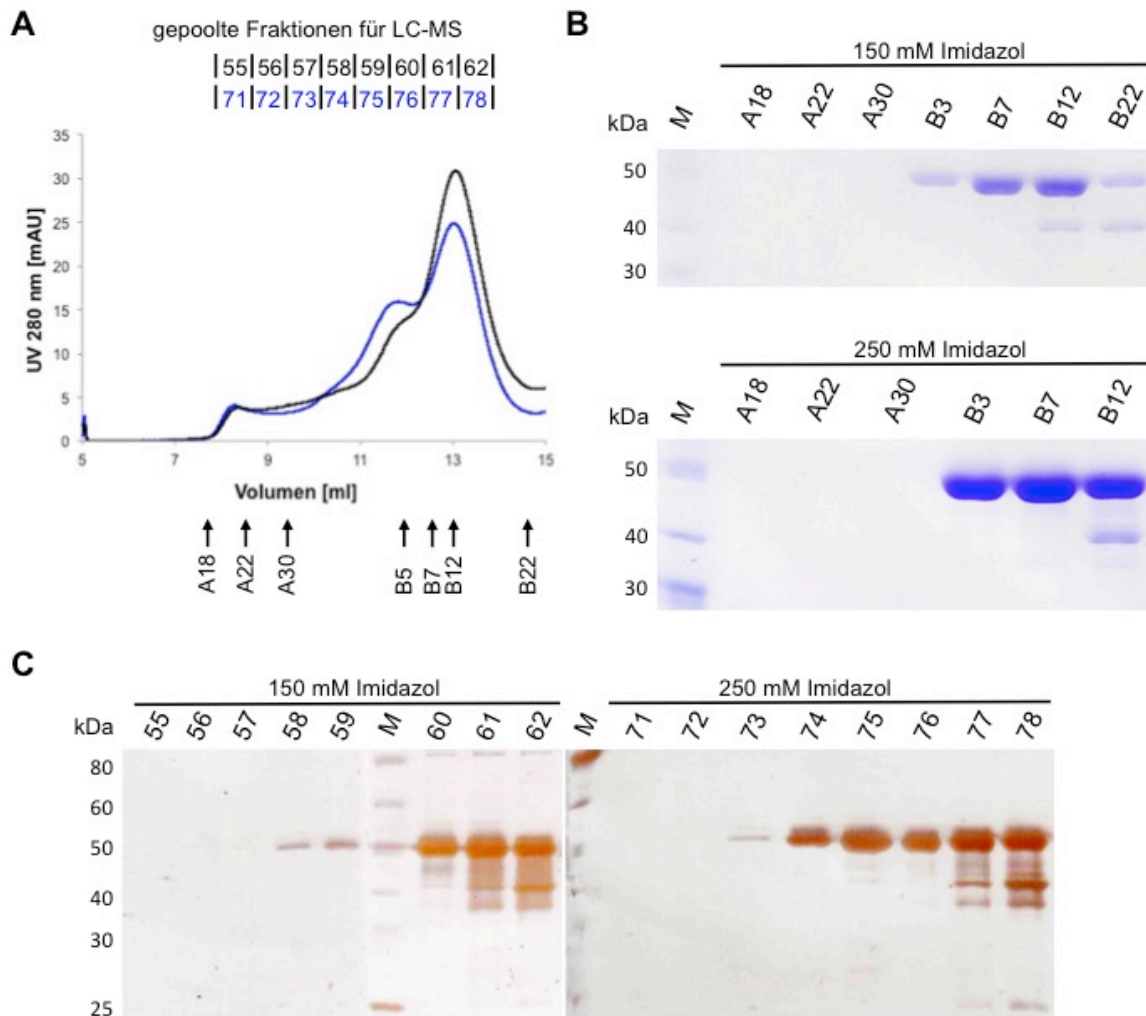
Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen A20 bis B17 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie mit der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.19 (**A** und **C**)). Die erste gepoolte Fraktion (47 bei 150 mM Imidazol und 63 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen A20-A24, die zweite aus den SEC-Fraktionen A25-A29 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 54 bzw. 70, die die vereinigten SEC-Fraktionen B13-B17 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 47-49, sowie 63-65 wurden jeweils 17 µl auf das SDS-Gel geladen, von den Proben 50 und 51, sowie 66 je 10 µl, von den Proben 52 und 53, sowie 68 und 69 je 2,5 µl und den Proben 54, sowie 67 und 70 je 5 µl (Abbildung 3.19 (**C**)).

### 3.2.8.2 Proteinreinigung von DegQSA aus JB53

Die DegQSA-Reinigung aus *E. coli* JB53-Zellen (*degP tsp*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 200 10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.20 (**A**)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.20 (**A** und **B**)). Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen A20 bis B17 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie mit der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.20 (**A** und **C**)). Die erste gepoolte Fraktion (55 bei 150 mM Imidazol und 71 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen A20-A24, die zweite aus den SEC-Fraktionen A25-A29 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 62 bzw. 78, die die vereinigten SEC-Fraktionen B13-B17 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 55-57, sowie 71-73 wurden jeweils 17 µl auf das SDS-Gel geladen, von den

Proben 58 und 59, sowie 74 und 75 je 10 µl, von den Proben 60-62, sowie 78 je 5 µl und den Proben 76 und 77 je 2,5 µl (Abbildung 3.20 (C)).

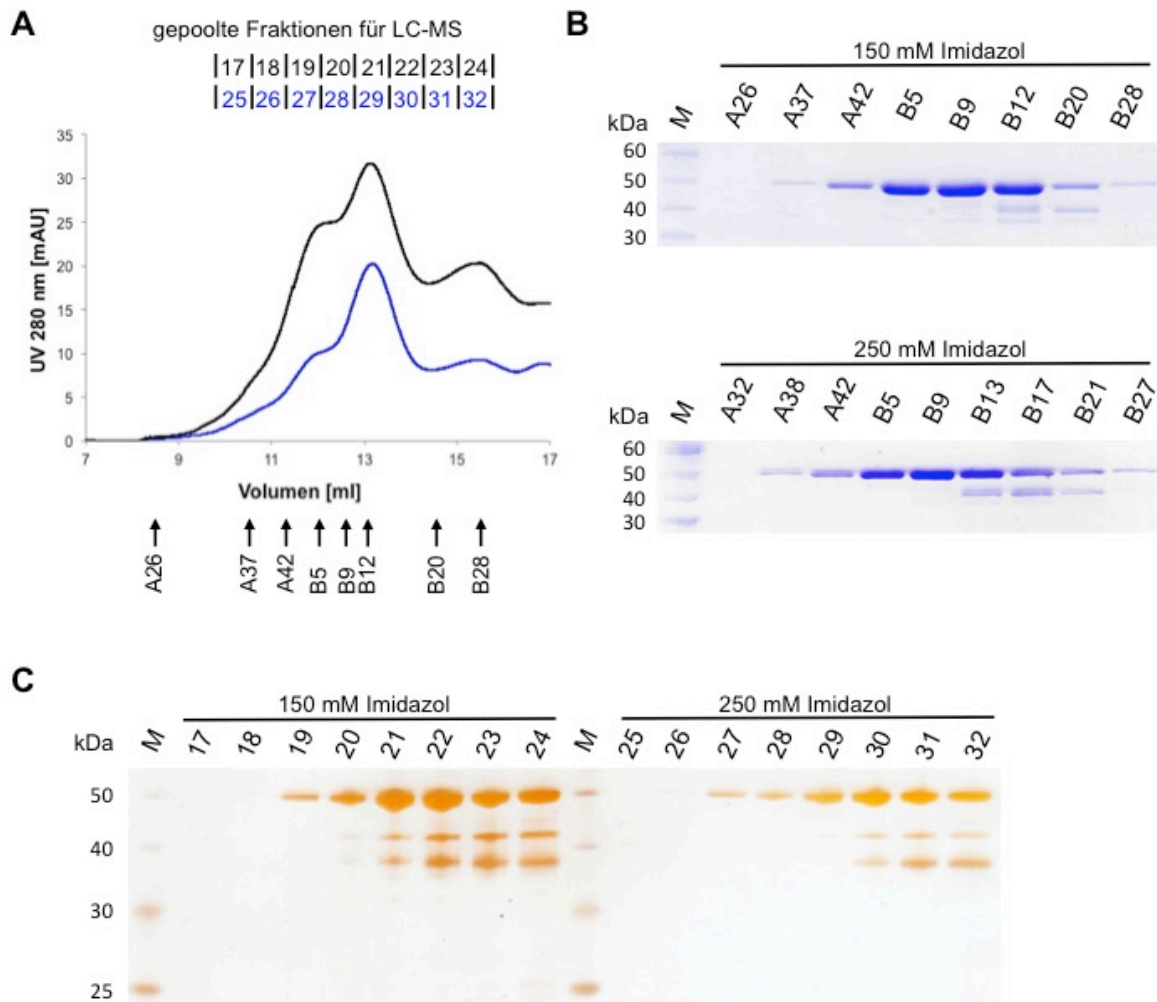


**Abbildung 3.20: Vorbereitung von DegQSA aus JB53 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der DegQSA-Reinigung aus JB53 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion A20 der SEC bis zur Fraktion B17 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 47-54 und 250 mM Imidazol: 63-70). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 47-49, sowie 63-65 wurden jeweils 17 µl, von den Proben 50 und 51, sowie 66 wurden je 10 µl, von den Proben 52 und 53, sowie 68 und 69 wurden je 2,5 µl und von den Proben 54, sowie 67 und 70 wurden jeweils 5 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

### 3.2.8.3 Proteinreinigung von DegQSA aus JB26

Die DegQSA-Reinigung aus *E. coli* JB26-Zellen (*degP ppiD*) erfolgte nach Überproduktion unter Stressbedingungen (0,5 M NaCl). Die Reinigung und deren Kontrolle erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben.



**Abbildung 3.21: Vorbereitung von DegQSA aus JB26 zur massenspektrometrischen Analyse**

(A) Die Elutionsfraktionen (150 mM und 250 mM Imidazol) der DegQSA-Reinigung aus JB26 wurden mittels SEC mit einer Superdex 200 10/300 weiter aufgetrennt. Bei dem Chromatogramm ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen der SEC sind unter dem Chromatogramm angegeben und unter (B) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert worden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen. (A) Über dem Chromatogramm sind die gepoolten Fraktionen für die Analyse mittels LC-MS angegeben. Jeweils ab Fraktion A25 der SEC bis zur Fraktion B22 wurden immer fünf Fraktionen vereinigt (150 mM Imidazol: 17-24 und 250 mM Imidazol: 25-32). (C) Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Von den Proben 17-18, sowie 25-26 wurden jeweils 20 µl, von den Proben 19, sowie 27 wurden je 10 µl, von den Proben 20-23, sowie 28-31 wurden je 5 µl und von den Proben 24, sowie 32 wurden jeweils 5 µl aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Größenstandard (M) aufgetragen.

Im Anschluss an die Reinigung wurden die Elutionsfraktionen 150 mM Imidazol und 250 mM Imidazol nacheinander in separaten SEC-Läufen auf eine Superdex 200

10/300-Säule aufgetragen (Abbildung 3.21 (A)). Von den Fraktionen der SEC wurden jeweils einzelne spezielle Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.21 (A und B)). Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die Fraktionen A25 bis B22 jeweils vom Lauf mit der bei 150 mM Imidazol eluierten Probe, sowie mit der bei 250 mM Imidazol eluierten Probe ausgewählt. Es wurden jeweils fünf SEC-Fraktionen vereinigt und ergaben so die gepoolten Fraktionen für die LC-MS, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert wurden (Abbildung 3.21 (A und C)). Die erste gepoolte Fraktion (17 bei 150 mM Imidazol und 25 bei 250 mM Imidazol) besteht aus den SEC-Fraktionen A25-A29, die zweite aus den SEC-Fraktionen A30-A34 und so weiter bis zur gepoolten LC-MS-Fraktion 24 bzw. 32, die die vereinigten SEC-Fraktionen B18-B22 enthält. Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen. Von den Proben 17-18, sowie 25-26 wurden jeweils 20 µl auf das SDS-Gel geladen, von den Proben 19, sowie 27 je 10 µl, von den Proben 20-23, sowie 28-31 je 5 µl und den Proben 24, sowie 32 je 2,5 µl (Abbildung 3.21 (C)).

#### **3.2.8.4 Massenspektrometrische Analysen von DegQSA aus *degP*-Doppelmutanten**

Die unter Stressbedingungen aus den Doppel-KO-Stämmen JB26, JB48 und JB53 gereinigten DegQSA-Proteine sollten mittels massenspektrometrischer Analyse durch eine LC-MS analysiert werden (2.4.12.1). Die potentiell gebundenen und somit mitgereinigten Substrate sollen neue Erkenntnisse über das Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli* geben.

Bei der Auswertung wurden alle als *carry over* ersichtlichen Proteine ausgeschlossen. Nach ersten Vorauswertungen wurden die Ergebnisse aller gepoolten SEC-Fraktionen für beide Elutionsfraktionen pro Reinigung zusammengefasst. Bei der Reinigung von DegQSA aus JB26 wurden jeweils Peptide von 24 zusätzlichen Proteinen durch die LC-MS gefunden. Die Reinigungen von DegQSA aus JB48 und JB53 lieferten Peptide die 30 Proteinen zugeordnet werden konnten. Dabei handelte es sich zum Großteil um identische Proteine.

Von diesen potentiellen Substraten wurden die 20 nach *MS/MS Count* am häufigsten gefundenen Proteine ausgewählt und nach ihrem Auftreten in den drei unterschiedlichen Reinigungen sortiert (Tabelle 3.9). Angegeben ist im Folgenden der zugehörige Genname statt des Proteins.

In allen drei Reinigungen wurden mit absteigender Häufigkeit die Proteine der zugehörigen Gene *ompA*, *ompC*, *acrA*, *metQ*, *dacA*, *fdoG*, *lpp* und *dcrB* gefunden. In zwei Reinigungen wurde *bamA*, *ydgA*, *yfhM* und *ompX* gefunden und in nur noch einer Reinigung *dacC*, *flu*, *slyB*, *lpoA*, *pal*, *osmE*, *tolC* und *opgG*. Zusätzlich wurden in diesen *MS/MS Count*-Bereichen weitere Faltungshelfer wie *spy*, *dsbA* (JB26 und JB53), *degS*, *prc* (JB48 und JB53), *surA*, *ppiD*, *fkpA* und *skp* gefunden, die jedoch zunächst nicht zu den Top20 der potentiellen Substrate gezählt wurden.

**Tabelle 3.9: Die 20 häufigsten Ergebnisse der LC-MS-Analyse der DegQSA-Reinigungen aus den *degP*-KO-Stämmen**

Dargestellt sind die zusammengefassten und gekürzten Ergebnisse der LC-MS-Analysen der DegQSA-Reinigungen aus den Deletionsmutanten JB26, JB48 und JB53. Es wurden die 20 nach *MS/MS Count* am häufigsten gefundenen Proteine nach ihrem Vorkommen in den drei Reinigungen sortiert. Die rot hinterlegten potentiellen Substrate kamen bei allen drei Reinigungen vor, die gelb hinterlegten in zwei Reinigungen. Zusätzlich konnten Faltungshelfer gefunden werden (grau hinterlegt), die zunächst nicht zu den 20 häufigsten Ergebnissen gezählt aber nicht vernachlässigt werden sollen.

Proteinname	Gencode	Masse (kDa)	UniProt
Outer membrane protein A	<i>ompA</i>	37,201	P0A910
Outer membrane protein C	<i>ompC</i>	40,368	P06996
Multidrug efflux pump subunit AcrA	<i>acrA</i>	42,197	P0AE06
D-methionine-binding lipoprotein MetQ	<i>metQ</i>	29,432	P28635
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacA	<i>dacA</i>	44,444	P0AEB2
Formate dehydrogenase-O major subunit	<i>fdoG</i>	112,549	P32176
Major outer membrane lipoprotein Lpp	<i>lpp</i>	8,323	P69776
Protein DcrB	<i>dcrB</i>	19,787	P0AEE1
Periplasmic chaperone Spy (Spheroplast protein Y)	<i>spy</i>	18,199	P77754
Outer membrane protein assembly factor BamA	<i>bamA</i>	90,553	P0A940
Protein YdgA	<i>ydgA</i>	54,689	P77804
Uncharacterized lipoprotein YfhM	<i>yfhM</i>	181,585	P76578
Outer membrane protein X	<i>ompX</i>	18,603	P0A917
Thiol:disulfide interchange protein DsbA	<i>dsbA</i>	23,105	P0AEG4
Serine endoprotease DegS	<i>degS</i>	37,581	P0AEE3
Tail-specific protease	<i>prc</i>	76,663	P23865
Chaperone SurA	<i>surA</i>	47,284	P0ABZ6
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacC	<i>dacC</i>	43,609	P08506
Antigen 43	<i>flu</i>	106,825	P39180
Outer membrane lipoprotein SlyB	<i>slyB</i>	15,602	P0A905
Penicillin-binding protein activator LpoA	<i>lpoA</i>	72,825	P45464
Peptidoglycan-associated lipoprotein	<i>pal</i>	18,824	P0A912
Osmotically-inducible lipoprotein E	<i>osmE</i>	12,021	P0ADB1
Outer membrane protein TolC	<i>tolC</i>	53,741	P02930
Glucans biosynthesis protein D	<i>opgG</i>	57,912	P33136
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	<i>ppiD</i>	68,15	P0ADY1
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkpA	<i>fkpA</i>	28,882	P45523
Chaperone protein Skp (Seventeen kilodalton protein)	<i>skp</i>	17,688	P0AEU7

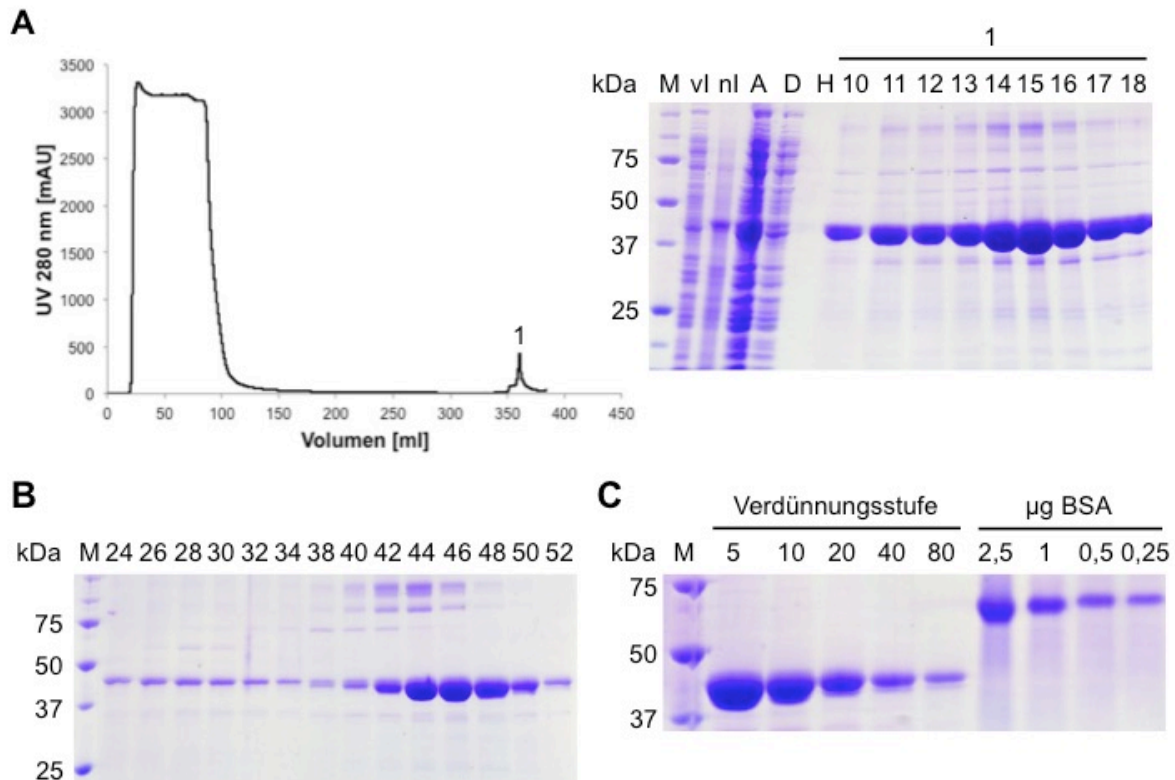
### 3.3 Proteinreinigungen für Degradationsassays

#### 3.3.1 Reinigung des Substrats EfeB

EfeB ist ein periplasmatisches Protein, welches in vorangegangenen Arbeiten als Substrat der drei Serinproteasen DegP, DegQ und Prc klassifiziert wurde. Für die Degradationsassays der vorliegenden Arbeit wurde EfeB gereinigt. Dazu wurde der Stamm SoluBL21 (Novagen) und das Plasmid pYcdB (Laborsammlung), welches für den *efeB*-Wildtyp kodiert, genutzt. Die Reinigung des Proteins wurde wie unter 2.4.3.2 beschrieben durchgeführt. Die einzelnen Schritte der Proteinreinigung sind unter Abbildung 3.22 dargestellt. Nach der Induktion mit AHT und der Produktion des Proteins wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen (2.2.1.8). Die Reinigung des Proteins erfolgte durch einen Strep-Tag mittels Affinitätschromatographie und anschließender SEC. Der Erfolg der Reinigung wurde kontrolliert, indem nach den jeweiligen Reinigungsschritten 10 µl Probe abgenommen wurden. Diese Proben wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (2.4.5) und anschließender Coomassie-Färbung (2.4.6) analysiert.

Die Abbildung 3.22 (A) zeigt die Induktion durch AHT während der Produktion (nl) und die jeweiligen Reinigungsschritte. Nach dem Auftragen des geklärten Zellysats auf die Strep-Tactin-Superflow-Säule konnten Verunreinigungen mit Hilfe der anschließenden Waschschrte mit LEW-Puffer und Hochsalzpuffer von der Säule entfernt werden. Das Protein wurde durch 2,5 mM Desthiobiotin eluiert (*Peak 1*) und durch SDS-PAGE in diesem *Peak* nachgewiesen (Fraktionen 10-18). Das isolierte Protein zeigt in der SDS-PAGE eine elektrophoretische Auftrennung gemäß seines theoretischen Molekulargewichts von etwa 47 kDa.

Im Anschluss wurden die Fraktionen 9-19 der Affinitätschromatographie vereinigt, einkonzentriert und durch eine SEC über eine Superdex 200 16/60 weiter gereinigt (**B**). Die Fraktionen 46 bis 54 wurden vereinigt, einkonzentriert und die Konzentration von EfeB durch den Vergleich mit bekannten Mengen an BSA bestimmt (**C**). Die einkonzentrierte EfeB-Probe wurde 1:5 bis 1:80 verdünnt und mit bekannten BSA-Mengen von verglichen. Es wurde eine Proteinkonzentration von 3 µg/µl bestimmt.



**Abbildung 3.22: Schritte der EfeB-Reinigung**

(A) Das Protein EfeB wurde nach Überproduktion und Zellaufschluss über eine Strep-Tactin-Superflow-Säule durch Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin gereinigt. Die SDS-PAGE-Analyse zeigt die Proben vor und nach Induktion (vl, nl), sowie das aufgetragene Zelllysate (A), den Durchfluss (D) und den Waschschritt mit Hochsalzpuffer (H). Außerdem wurden verschiedene Fraktionen (10-18) des Elutionspeaks (1) auf das SDS-Gel aufgetragen. Ein weiterer Reinigungsschritt erfolgte durch eine SEC über eine Superdex 200 16/60 (B). Es sind einzelne Fraktionen der SEC durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung dargestellt. (C) zeigt die Mengenabschätzung des gereinigten Proteins EfeB im Vergleich zu bekannten Mengen an BSA. Die einkonzentrierte EfeB-Probe wurde 1:5 bis 1:80 verdünnt. Von BSA wurden 2,5 µg, 1 µg, 0,5 µg und 0,25 µg aufgetragen. Von allen Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen und es wurde ein Größenstandard (M) verwendet.

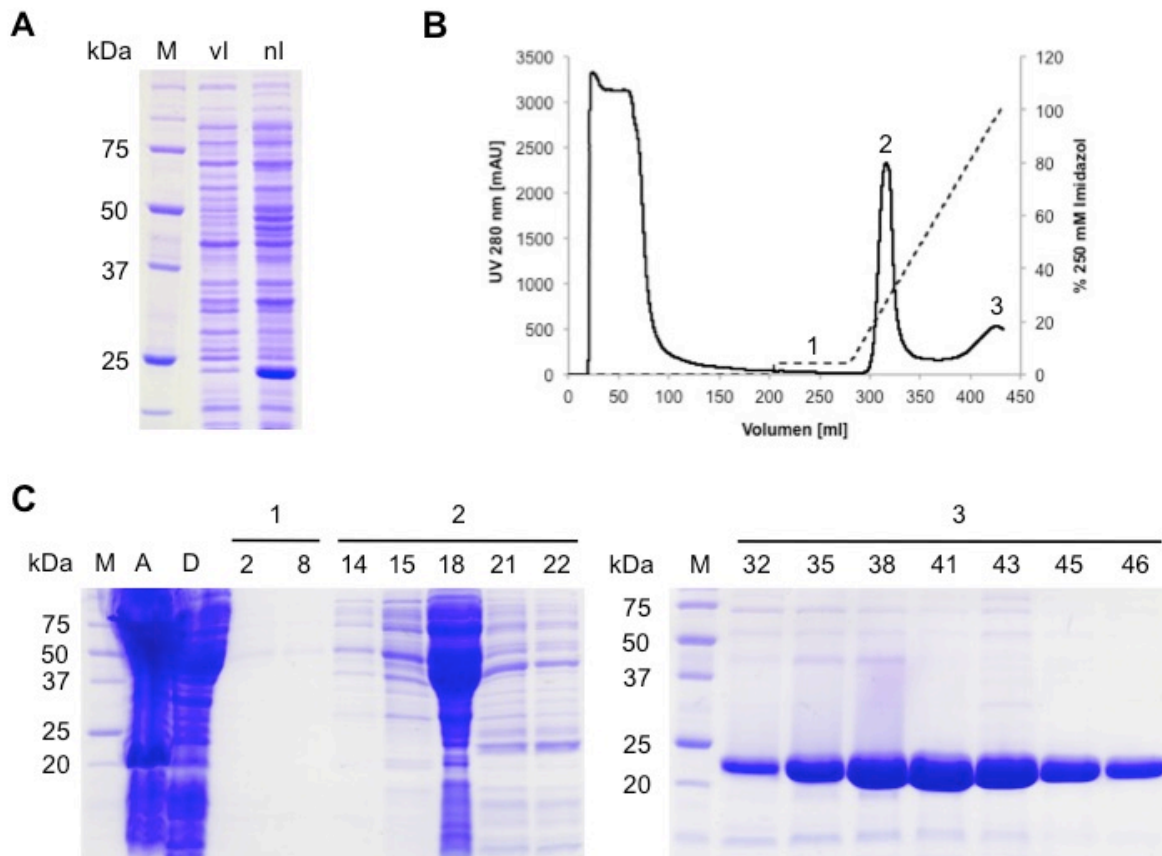
### 3.3.2 Reinigung verschiedener Faltungshelfer

Neben dem Substrat wurden die drei Faltungshelfer DsbAPT, PpiD und SurA gereinigt. Es wurde dabei wie unter 2.4.3.1 beschrieben vorgegangen. Die Überproduktion erfolgte in dem Stamm BW30270 durch Einbringen der Plasmide pYB007\_DsbAPT, pYB008\_PpiD und pYB009\_SurA.

#### 3.3.2.1 Reinigung von DsbAPT

Das Plasmid pYB007\_DsbAPT kodiert für eine inaktive Mutante von *dsbA*, bei welcher an der Stelle 151 ein Prolin durch ein Threonin ausgetauscht wurde. Die einzelnen Schritte der Proteinreinigung sind unter Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24

dargestellt. Nach der Induktion mit IPTG und der Produktion des Proteins wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen (2.2.1.8). Die Reinigung des Proteins erfolgte durch einen His-Tag mittels Affinitätschromatographie und anschließender SEC. Der Erfolg der Reinigung wurde kontrolliert indem nach den jeweiligen Reinigungsschritten 10 µl Probe abgenommen wurden. Diese Proben wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (2.4.5) und anschließender Coomassie-Färbung (2.4.6) analysiert.



**Abbildung 3.23: Induktion und Affinitätschromatographie der DsbAPT-Reinigung aus BW30270**

Das Protein DsbAPT wurde im Stamm BW30270 überproduziert. Die Produktion wurde durch SDS-PAGE kontrolliert. Unter (A) ist der Zustand der DsbAPT-Produktion vor und nach Induktion (vl und nl) durch IPTG gezeigt. Nach dem Zellaufschluss erfolgte eine Reinigung über eine Ni-NTA Säule (B) durch Elution mit einem Imidazolgradienten (10 mM bis 250 mM). Die SDS-PAGE-Analyse (C) zeigt das aufgetragene Zellysate (A), den Durchfluss (D) und den Waschschrift mit LEW-Puffer mit einer Konzentration an 10 mM Imidazol (1, Fraktionen 2 und 8). Außerdem wurden die Fraktionen 14, 15, 18, 21 und 22 des Elutionspeaks (2) und die Fraktionen 32, 35, 38, 41, 43, 45 und 46 des Elutionspeaks (3) auf SDS-Gele aufgetragen. Von allen Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen und es wurde ein Größenstandard (M) verwendet.

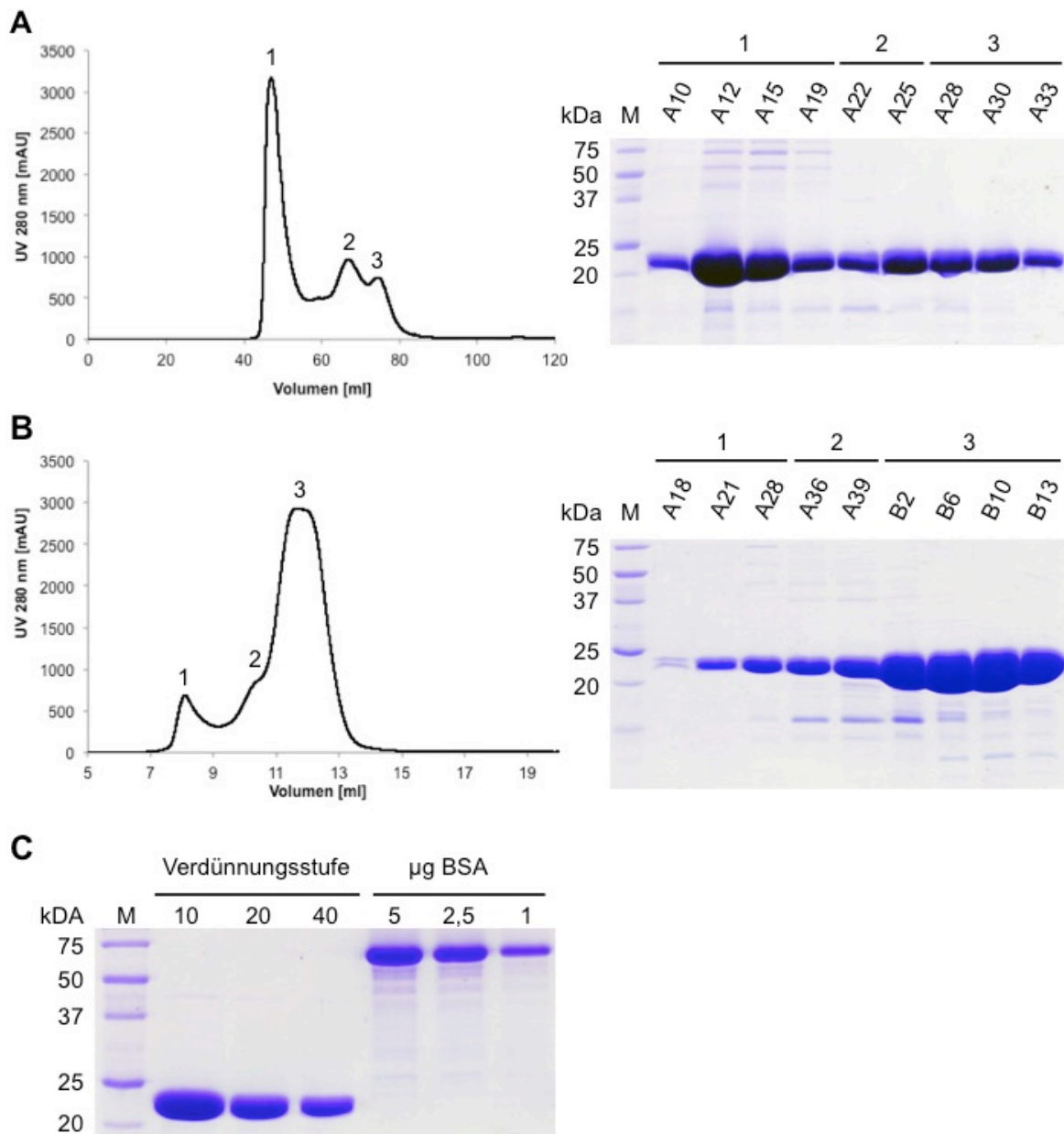
Die Abbildung 3.23 zeigt die Induktion durch IPTG während der Produktion (A) und die jeweiligen Reinigungsschritte (C). Nach dem Auftragen des geklärten Zellysats auf die Ni-NTA Säule konnten Verunreinigungen mit Hilfe der anschließenden Waschschrift mit LEW-Puffer und LEW-Puffer mit 10 mM Imidazol von der Säule



entfernt werden. Das Protein wurde durch einen Imidazolgradienten von der Säule eluiert und durch SDS-PAGE nachgewiesen. Während es sich bei dem *Peak 2* um Verunreinigungen handelt, wurde das Protein DsbAPT im *Peak 3* nachgewiesen. Das isolierte Protein zeigt in der SDS-PAGE eine elektrophoretische Auftrennung gemäß seines theoretischen Molekulargewichts von etwa 22 kDa.

Es wurden die Fraktionen 31-46 der Affinitätschromatographie (Abbildung 3.23 **(C)**) vereinigt, einkonzentriert und durch eine SEC über eine Superdex 75 16/60 *HiLoad* weiter gereinigt (Abbildung 3.24 **(A)**). Der Verlauf der Reinigung wurde weiterhin durch SDS-PAGE-Analysen kontrolliert. Die Fraktionen A20-A34 der Elutionspeaks 2 und 3 zeigten einen höheren Reinheitsgrad als die Fraktionen des *Peaks 1* und wurden vereinigt, einkonzentriert und mit 10 mM DTT versetzt um mit einer anschließenden zweiten SEC weitere Verunreinigungen zu entfernen.

Die zweite SEC erfolgte mit einer kleineren Säule (Superdex 75 10/300) und Gelfiltrationspuffer der mit 10 mM DTT versetzt wurde (Abbildung 3.24 **(B)**). Das Chromatogramm zeigt die *Peaks 1, 2* und *3* und die SDS-PAGE-Analyse zugehörige Fraktionen. Anhand dieses SDS-Gels wurden die Fraktionen B3-B16 zur weiteren Verwendung ausgewählt und vereinigt. Das DTT wurde weitgehend entfernt, die Probe einkonzentriert und die Konzentration durch den Abgleich mit bekannten BSA-Mengen bestimmt (Abbildung 3.24 **(C)**). Die Proteinkonzentration der DsbAPT-Probe beträgt 10 µg/µl.



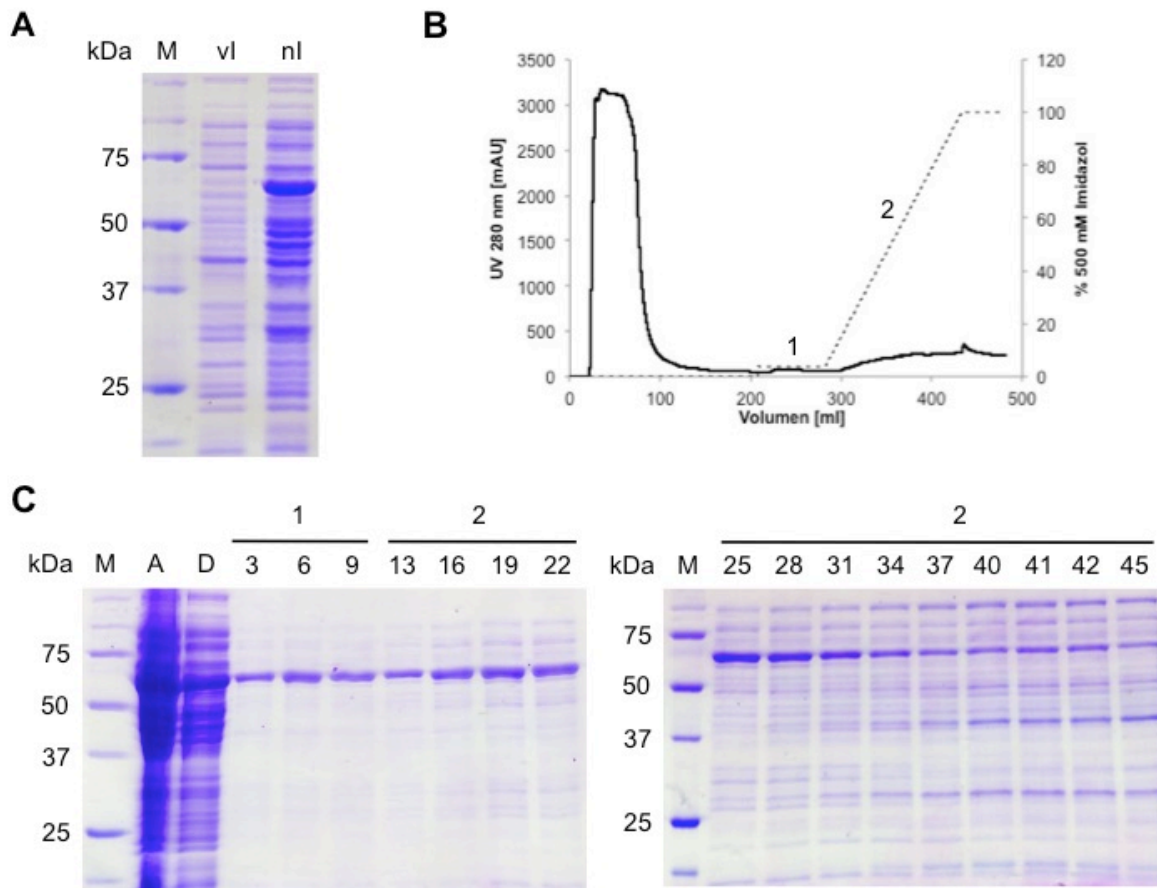
**Abbildung 3.24: SEC und Konzentrationsbestimmung von DsbAPT aus BW30270**

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie von DsbAPT aus BW30270 folgte eine SEC mit einer Superdex 75 16/60 (**A**). Die Fraktionen A20-A34 wurden mit DTT versetzt in einer zweiten SEC mit einer Superdex 75 10/300 weiter gereinigt (**B**). Dargestellt sind jeweils die Chromatogramme, bei denen das UV-Signal bei 280 nm gemessen wurde und die entsprechenden SDS-PAGE-Abbildungen der zugehörigen Proben. Zusammengehörige *Peaks* und Proben sind in beiden Abbildungsteilen entsprechend beschriftet. Die Fraktionen B3-B16 wurden vereinigt, das DTT entfernt und nach dem Einkonzentrieren die Proteinkonzentration durch den Abgleich mit bekannten Mengen an BSA bestimmt (**C**). Die DsbAPT-Probe wurde 1:10, 1:20 und 1:40 verdünnt und die aufgetragenen Mengen an BSA entsprachen 5  $\mu$ g, 2,5  $\mu$ g und 1  $\mu$ g. Von allen Proben wurden jeweils 10  $\mu$ l aufgetragen und es wurde ein Größenstandard (M) verwendet.

### 3.3.2.2 Reinigung von PpiD

Das Plasmid pYB008\_PpiD kodiert für die periplasmatische Domäne von *ppiD*. Die einzelnen Schritte der Proteinreinigung sind unter Abbildung 3.25, Abbildung 3.26 und Abbildung 3.27 dargestellt. Nach der Induktion mit IPTG und der Produktion des Proteins wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen (2.2.1.8). Die Reinigung des Proteins erfolgte durch einen His-Tag mittels Affinitätschromatographie und anschließender SEC, der eine Anionenaustauschchromatographie angeschlossen wurde. Der Erfolg der Reinigung wurde kontrolliert, indem nach den jeweiligen Reinigungsschritten 10 µl Probe abgenommen wurden. Diese Proben wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (2.4.5) und anschließender Coomassie-Färbung (2.4.6) analysiert. Das Protein PpiD zeigt in der SDS-PAGE eine elektrophoretische Auftrennung gemäß seines theoretischen Molekulargewichts von etwa 67 kDa.

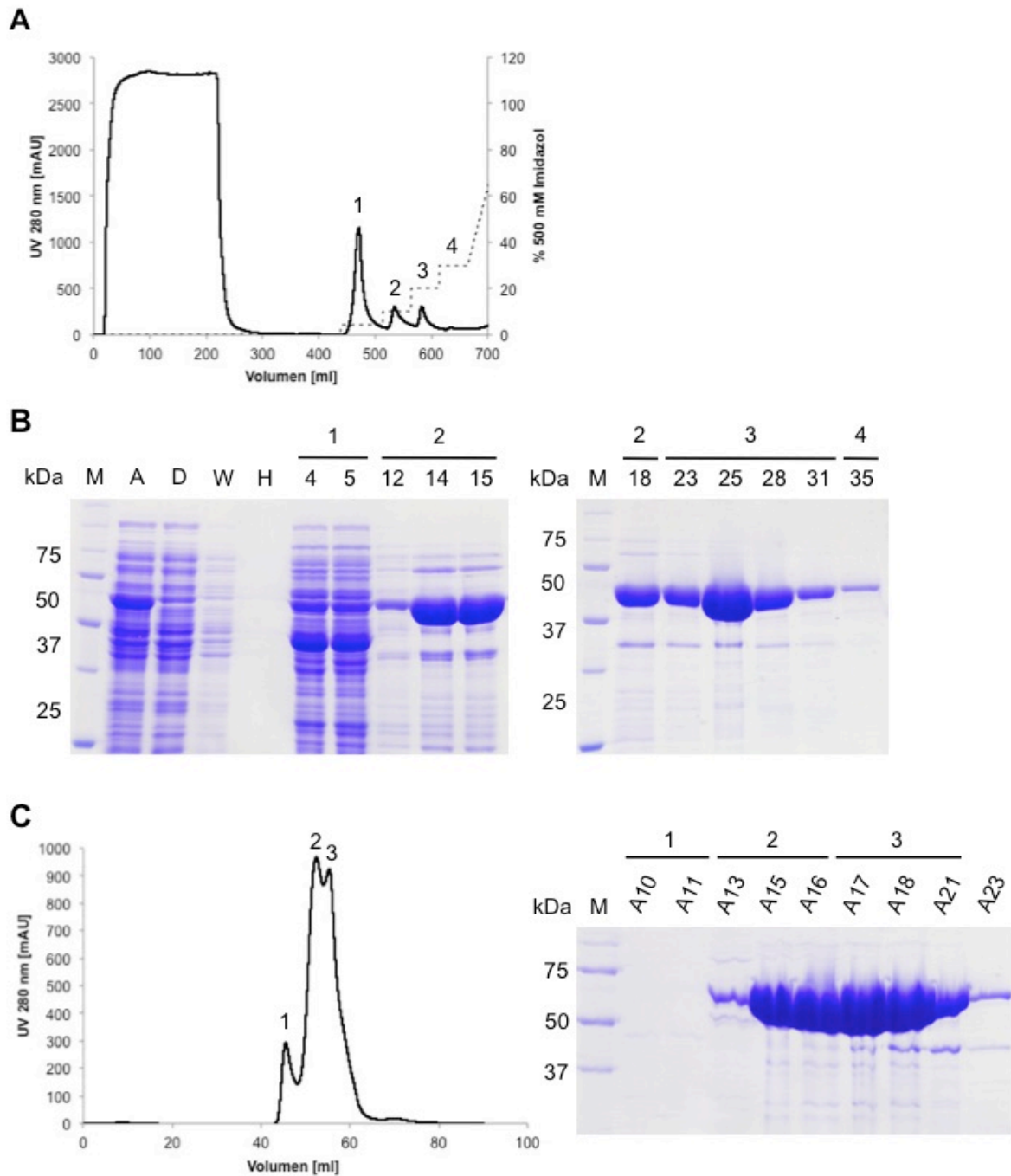
Die Abbildung 3.25 zeigt die Induktion durch IPTG während der Produktion (**A**) und die jeweiligen Reinigungsschritte (**C**). Nach dem Auftragen des geklärten Zellysats auf die Ni-TED Säule, wurde diese mit LEW-Puffer und LEW-Puffer mit 20 mM Imidazol gewaschen. Das Protein sollte durch einen Imidazolgradienten von der Säule eluiert werden. Durch die SDS-PAGE-Analyse konnte gezeigt werden, dass das Protein PpiD teilweise bereits in dem Waschschrift mit 20 mM Imidazol eluiert wurde. Dazu wurden die ersten 35 Fraktionen gepoolt, einkonzentriert und durch die Zugabe des zuvor aufgefangenen Durchflusses und der Waschschrift auf eine so geringe Imidazolkonzentration verdünnt, dass die Probe in diesem Zustand auf eine mit LEW-Puffer äquilibrierte Ni-NTA Säule geladen werden konnte.



**Abbildung 3.25: Induktion und Affinitätschromatographie der PpiD-Reinigung aus BW30270**

Das Protein PpiD wurde im Stamm BW30270 überproduziert. Die Produktion wurde durch SDS-PAGE kontrolliert. Unter (A) ist der Zustand der PpiD-Produktion vor und nach Induktion (vl und nl) durch IPTG gezeigt. Nach dem Zellaufschluss erfolgte eine Reinigung über eine Ni-TED Säule (B) durch Elution mit einem Imidazolgradienten (20 mM bis 500 mM). Die SDS-PAGE-Analyse (C) zeigt das aufgetragene Zelllysate (A), den Durchfluss (D) und den Waschschritt mit LEW-Puffer mit einer Konzentration an 10 mM Imidazol (1, Fraktionen 3, 6 und 9). Außerdem wurden die Fraktionen 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 41, 42 und 45 des Elutionsgradienten (2) aufgetragen. Von allen Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen und es wurde ein Größenstandard (M) verwendet.

Abbildung 3.26 (A) zeigt das Chromatogramm der Reinigung und (B) die zugehörigen Reinigungsschritte in der SDS-PAGE-Analyse. Zusammengehörige Peaks und Proben sind in beiden Abbildungsteilen entsprechend beschriftet. Die Säule wurde mit LEW- und Hochsalzpuffer (W und H) gewaschen und das Protein anschließend mit einer Kombination aus Imidazolstufen- und -gradientenprotokoll (20 mM-50 mM-100 mM-150 mM, danach 80-ml-Gradient auf 500 mM) eluiert. Bei dem Elutionspeak 1 bei 20 mM Imidazol wurden hauptsächlich Verunreinigungen von der Säule gewaschen. Der Elutionspeak 2 enthielt neben PpiD ebenfalls noch recht viele Verunreinigungen. Einen höheren Reinheitsgrad hatte das Protein, welches im Elutionspeak 3 von der Säule gewaschen wurde.

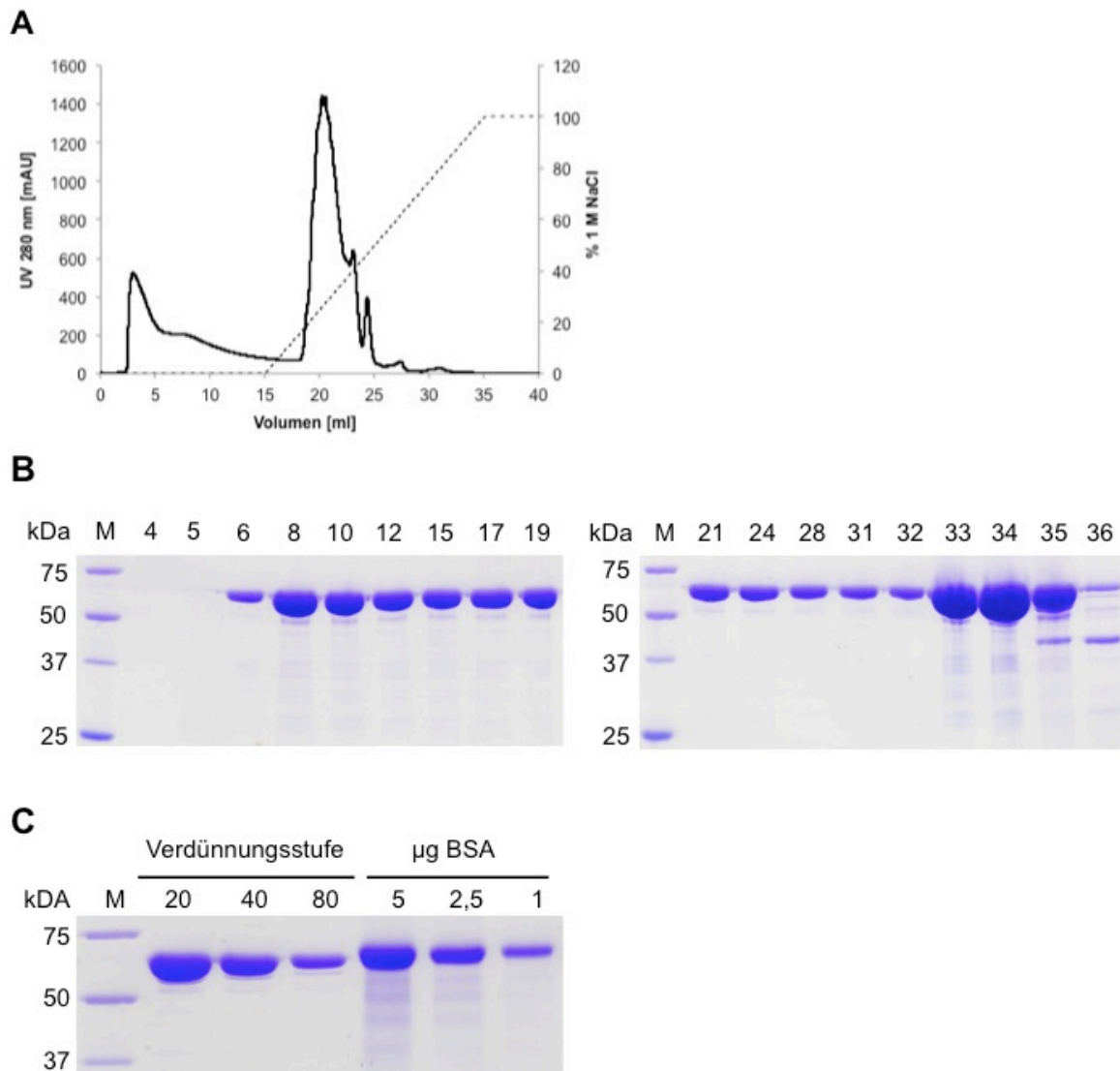


**Abbildung 3.26: Affinitätschromatographie und SEC von PpiD aus BW30270**

Reinigung von PpiD aus BW30270 über eine Ni-NTA Säule. **(A)** zeigt das Chromatogramm, bei dem das UV-Signal bei 280 nm gemessen wurde und **(B)** die entsprechende SDS-PAGE-Abbildung der zugehörigen Proben. Aufgetragen sind die Proben Auftrag (A), Durchfluss (D), ein Waschschrift mit LEW-Puffer (W), sowie einer mit Hochsalzpuffer (H). Die Elutionsstufen und daraus resultierende *Peaks* (1-4) sind bei 20 mM, 50 mM, 100 mM und 150 mM Imidazol in LEW-Puffer. Die Fraktionen 24-35 wurden vereinigt und über eine SEC mit einer Superdex 75 16/60 **(C)** weiter gereinigt. Von allen Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen und es wurde ein Größenstandard (M) verwendet.

Es wurden die Fraktionen 24-35 der Affinitätschromatographie über die Ni-NTA Säule vereinigt, einkonzentriert und durch eine SEC über eine Superdex 75 16/60 *HiLoad* weiter gereinigt (Abbildung 3.26 **(C)**). Da die SEC nicht zielführend war, weil

die noch vorhandenen Verunreinigungen weiterhin in den Fraktionen mit dem Zielprotein nachweisbar waren, wurden die proteinenthaltenden Fraktionen wieder vereinigt, einkonzentriert und in Tris-Puffer umgepuffert. Im Anschluss wurde eine Anionenaustauschchromatographie mit einer MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) durchgeführt (Abbildung 3.27 (A und B)). Das gebundene Protein wurde mit einem NaCl-Gradienten (0 M bis 1 M, 20-ml-Gradient) eluiert.



**Abbildung 3.27: Anionenaustauschchromatographie und Konzentrationsbestimmung von PpiD aus BW30270**

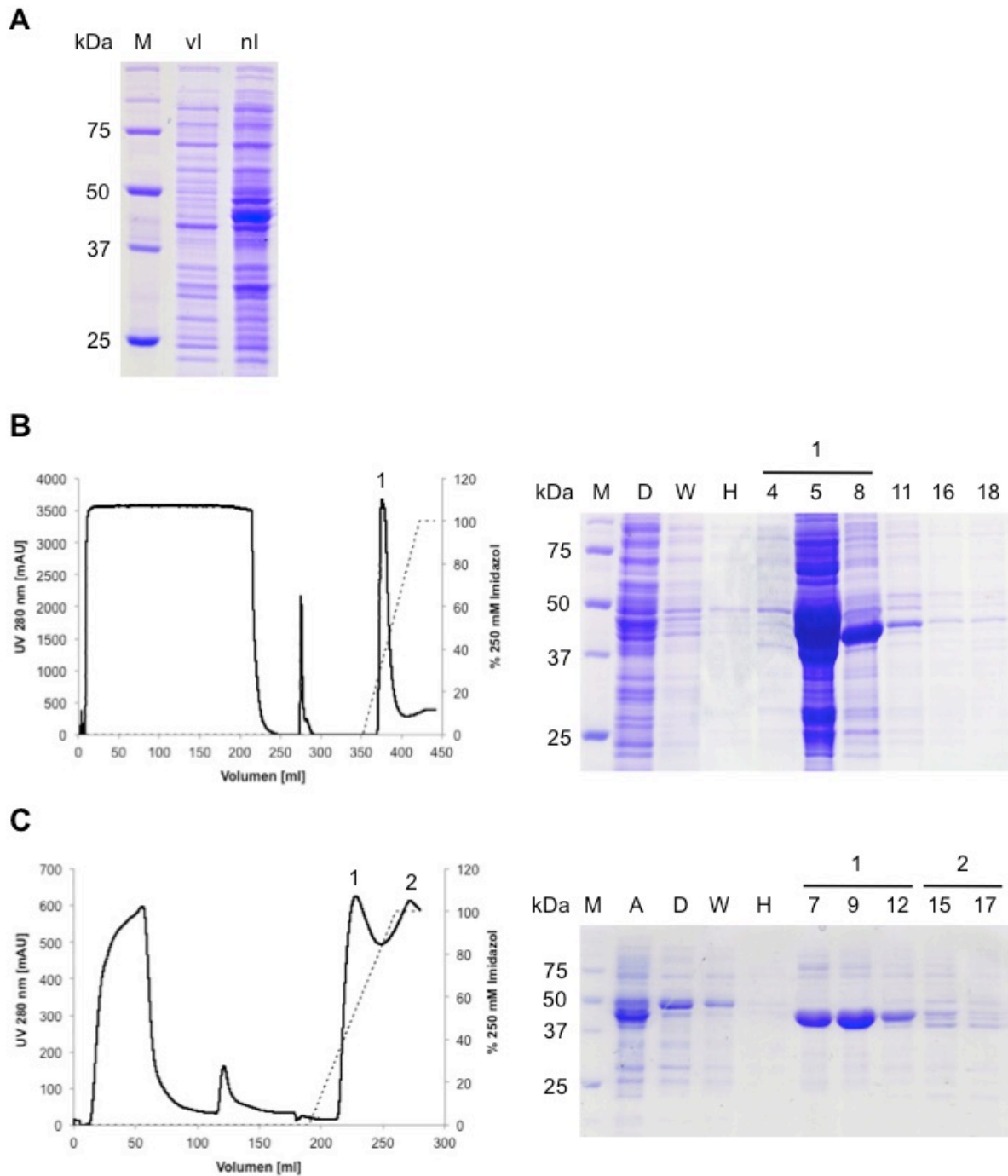
Die weitere Reinigung des Proteins PpiD erfolgte über eine Anionenaustauschchromatographie durch eine MonoQ 5/50 GL Säule (A und B). Bei dem Chromatogramm (A) ist das eluierte Puffervolumen gegen das UV-Signal bei 280 nm aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (B). Die Fraktionen 6-32 wurden vereinigt und nach dem Einkonzentrieren die Proteinkonzentration durch den Abgleich mit bekannten Mengen an BSA bestimmt (C). Die PpiD-Probe wurde 1:20, 1:40 und 1:80 verdünnt und die aufgetragenen Mengen an BSA entsprachen 5 µg, 2,5 µg und 1 µg. Von allen Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen und es wurde ein Größenstandard (M) verwendet.

Die Fraktionen sechs bis 32 wurden vereinigt und einkonzentriert. Die Konzentration der PpiD-Probe wurde durch den Abgleich mit bekannten BSA-Mengen bestimmt (Abbildung 3.27 (C)) und beträgt 14 µg/µl.

### 3.3.2.3 Reinigung von SurA

Das Plasmid pYB009\_SurA kodiert für Wildtyp *surA*. Die einzelnen Schritte der Proteinreinigung sind unter Abbildung 3.28 und Abbildung 3.29 dargestellt. Nach der Induktion mit IPTG und der Produktion des Proteins wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen (2.2.1.8). Die Reinigung des Proteins erfolgte durch einen His-Tag mittels Affinitätschromatographie und anschließender SEC. Der Erfolg der Reinigung wurde kontrolliert indem nach den jeweiligen Reinigungsschritten 10 µl Probe abgenommen wurden. Diese Proben wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (2.4.5) und anschließender Coomassie-Färbung (2.4.6) analysiert. Das SurA zeigt in der SDS-PAGE eine elektrophoretische Auftrennung gemäß seines theoretischen Molekulargewichts von etwa 46 kDa.

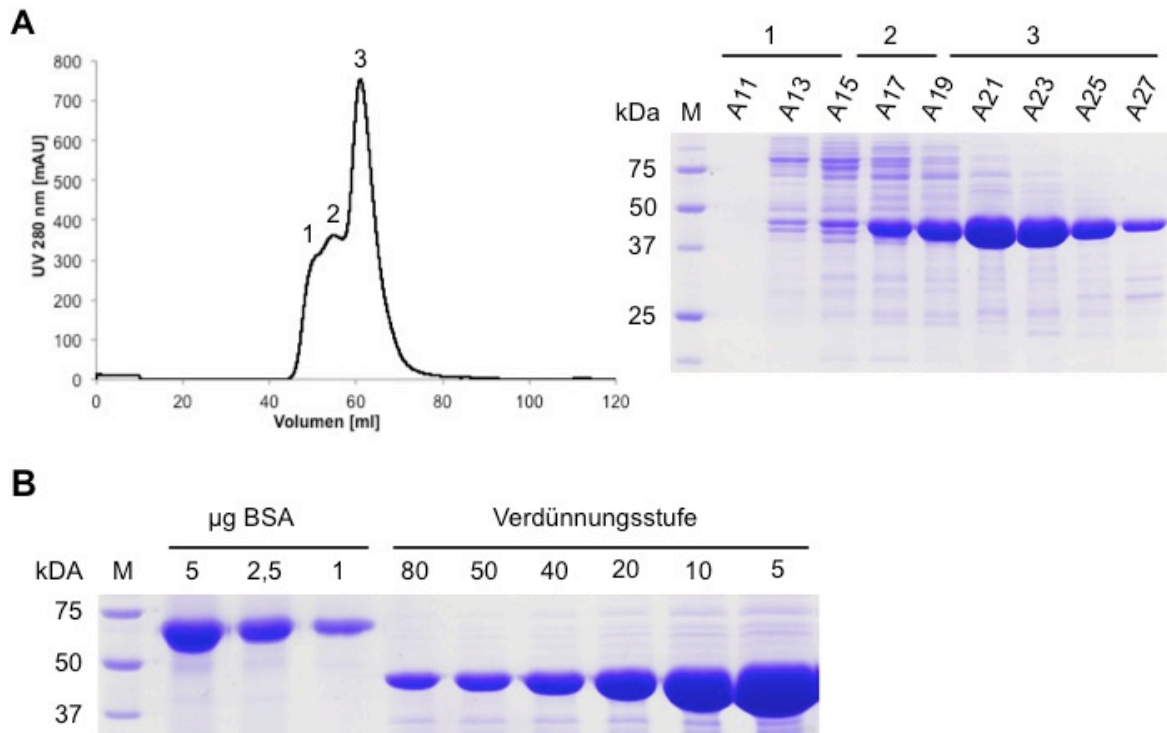
Die Abbildung 3.28 (A) zeigt die Induktion durch IPTG während der Produktion. Das Chromatogramm, bei dem das UV-Signal bei 280 nm gemessen wurde und die entsprechende SDS-PAGE-Abbildung der zugehörigen Proben (Abbildung 3.28 (B)) zeigt die einzelnen Reinigungsschritte der Reinigung über eine Ni-NTA Säule. Nach dem Auftragen des geklärten Zellysats auf die Ni-NTA Säule konnten Verunreinigungen mit Hilfe der anschließenden Waschschrte mit LEW-Puffer und Hochsalzpuffer von der Säule entfernt werden. Bei der Elution des Zielproteins wurden sehr viele Verunreinigungen nachgewiesen, wodurch nach dem Umpuffern zu LEW-Puffer eine zweite Affinitätschromatographie über eine Ni-TED Säule durchgeführt wurde (Abbildung 3.28 (C)). Es wurden die Fraktionen 6-12 der Affinitätschromatographie vereinigt, einkonzentriert und durch eine SEC über eine Superdex 75 16/60 HiLoad weiter gereinigt (Abbildung 3.29 (A)). Das Chromatogramm zeigt die *Peaks* 1, 2 und 3 und die SDS-PAGE-Analyse die zugehörigen Fraktionen. Anhand dieses SDS-Gels wurden die Fraktionen A21-A27 zur weiteren Verwendung ausgewählt, vereinigt und einkonzentriert. Die Proteinkonzentration wurde durch den Abgleich mit bekannten BSA-Mengen bestimmt (Abbildung 3.29 (B)). Die Proteinkonzentration der SurA-Probe beträgt 8 µg/µl.



**Abbildung 3.28: Induktion und Affinitätschromatographie der SurA-Reinigung aus BW30270**

Das Protein SurA wurde im Stamm BW30270 überproduziert. Die Produktion wurde durch SDS-PAGE kontrolliert. Unter (A) ist der Zustand der SurA-Produktion vor und nach Induktion (vl und nl) durch IPTG gezeigt. Nach dem Zellaufschluss erfolgte eine Reinigung über eine Ni-NTA Säule (B) durch Elution mit einem Imidazolgradienten (bis 250 mM). Die SDS-PAGE-Analyse zeigt den Durchfluss (D), einen Waschschritt mit LEW-Puffer (W), sowie mit Hochsalzpuffer (H). Die Fraktionen 4, 5 und 8, die zum Elutionspeak 1 gehören, zeigen viel, aber sehr verunreinigtes Protein. Deshalb wurde eine weitere Reinigung mittels Affinitätschromatographie über eine Ni-TED Säule angeschlossen (C). Die SDS-PAGE-Analyse zeigt den Auftrag (A), den Durchfluss (D), einen Waschschritt mit LEW-Puffer (W) und mit Hochsalzpuffer (H). In den Fraktionen 7 und 9 des 1. Elutionspeaks wurden nach SDS-PAGE-Analyse das meiste SurA-Protein eluiert. Von allen Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen und es wurde ein Größenstandard (M) verwendet.





**Abbildung 3.29: SEC und Konzentrationsbestimmung von SurA aus BW30270**

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie von SurA aus BW30270 folgte eine SEC mit einer Superdex 75 16/60. Dargestellt ist das Chromatogramm, bei dem das UV-Signal bei 280 nm gemessen wurde und die entsprechenden SDS-PAGE-Abbildung der zugehörigen Proben (**A**). Die Fraktionen A21-A27 wurden vereinigt und nach dem Einkonzentrieren die Proteinkonzentration durch den Abgleich mit bekannten Mengen an BSA bestimmt (**B**). Die SurA-Probe wurde 1:80, 1:50, 1:40, 1:20, 1:10 und 1:5 verdünnt und die aufgetragenen Mengen an BSA entsprachen 5 µg, 2,5 µg und 1 µg. Von allen Proben wurden jeweils 10 µl aufgetragen und es wurde ein Größenstandard (M) verwendet.

### 3.4 Degradationsassays

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Degradationsassays mit den Proteasen DegP, DegQ und Prc durchgeführt um die proteolytische Aktivität der drei Serinproteasen in Bezug auf das Substrat EfeB unter Zugabe von Proteinen der Proteinqualitätskontrolle zu untersuchen. Die drei Proteasen wurden von Dr. Melisa Merdanovic (DegP), Marcell Müller (DegQ) und Christina Au Yeung (Prc) gereinigt. Die Reinigungen der verwendeten Faltungshelfer DsbAPT, PpiD und SurA, sowie des Substrats EfeB wurde im Rahmen dieser Arbeit (3.3) durchgeführt. Durch Vorarbeiten waren die prinzipiellen Pufferbedingungen für die Proteasen bekannt. Für DegP und Prc wurde LEW-Puffer pH 8 als Reaktionspuffer eingesetzt, für DegQ

hatte sich Propionsäurepuffer pH 5,5 etabliert. Zunächst wurden die weiteren Bedingungen für die Degradationsassays ausgetestet.

### 3.4.1 Etablierung der Degradationsassays

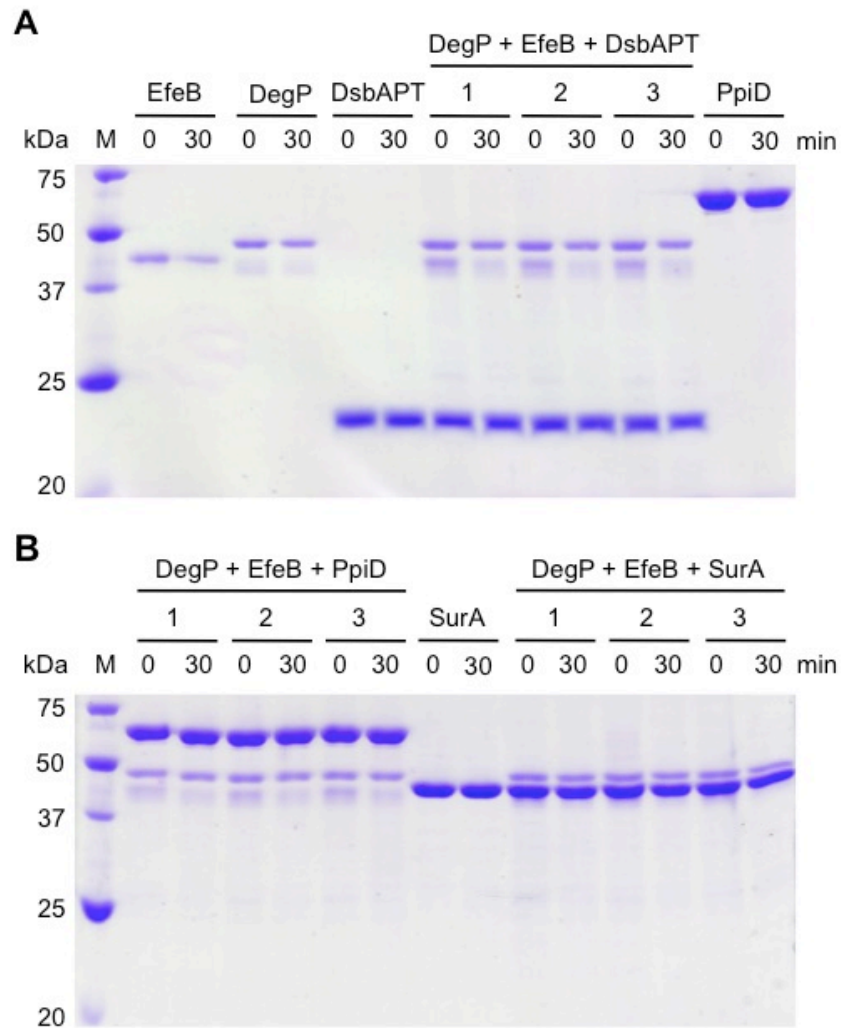
Für die Bestimmung der optimalen Bedingungen des Degradationsassays mit den unterschiedlichen Proteasen wurden verschiedene Vortests durchgeführt. Erste Versuche wurden mit den Substraten Malatdehydrogenase bei DegP,  $\alpha$ -Casein bei DegQ und  $\beta$ -Casein bei Prc durchgeführt. Es wurde getestet, ob das Detergenz Urea oder Guanidiniumchlorid genutzt werden sollte und welche Konzentration an Detergenz die Proteasen tolerieren bevor sie ihre proteolytische Aktivität verlieren. Das Detergenz wurde benötigt, um das im Degradationsassay verwendete Substrat zu denaturieren. Dadurch sollten die in die Proteinqualitätskontrolle involvierten, periplasmatischen Serinproteasen das Substrat degradieren können. Es wurde auch ein Testverdau mit dem periplasmatischen Substrat EfeB durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es wurde das Detergenz Urea ausgewählt. Für DegP wurde 1 M Urea festgelegt, für DegQ und Prc 1,5 M Urea. Von den Proteasen wurden jeweils 1,5  $\mu$ M, von dem in 8 M Urea denaturierten Substrat EfeB wurden 5  $\mu$ M und von den Faltungshelfern DsbAPT, PpiD und SurA je 7,5  $\mu$ M eingesetzt. Außerdem wurden für die Proteasen DegP und Prc 50  $\mu$ M des Aktivatorpeptids YcdB und für die Protease DegQ 100  $\mu$ M des Aktivatorpeptids YWF getestet. Da in Vortests jedoch keine Aktivierung durch die Zugabe von Aktivierungspeptid zu erkennen war (Daten nicht gezeigt), wurden die Degradationsassays mit Aktivatorpeptid nicht weiterverfolgt. Als Zeitpunkte für den zeitlichen Verlauf der Proteolyse wurden der Startpunkt (0 min), 1 min, 15 min und 30 min gewählt.

### 3.4.2 Degradationsassays mit Faltungshelfern

Es sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob sich durch die Zugabe von Faltungshelfern zu den Degradationsassays das Schnittmuster der Serinproteasen DegP, DegQ und Prc ändert. Besonderes Interesse wurde darauf gelegt, ob zum Beispiel bestimmte Bereiche des denaturierten Substrats EfeB durch die Zugabe der Faltungshelfer DsbAPT, PpiD und SurA protektiert werden und somit ein Abbau des Substrats verhindert oder verzögert wird.

### 3.4.2.1 DegP-Degradationsassays mit verschiedenen Faltungshelfern

Die Durchführung der Degradationsassays ist unter 2.4.10 genau beschrieben. Die entnommenen Proben wurden wie unter 2.4.11 beschrieben mit Aceton gefällt und die entstandenen Peptidfragmente im Anschluss massenspektrometrisch analysiert (2.4.12.2).



**Abbildung 3.30: Einsatz von Faltungshelfern im DegP-Degradationsassay**

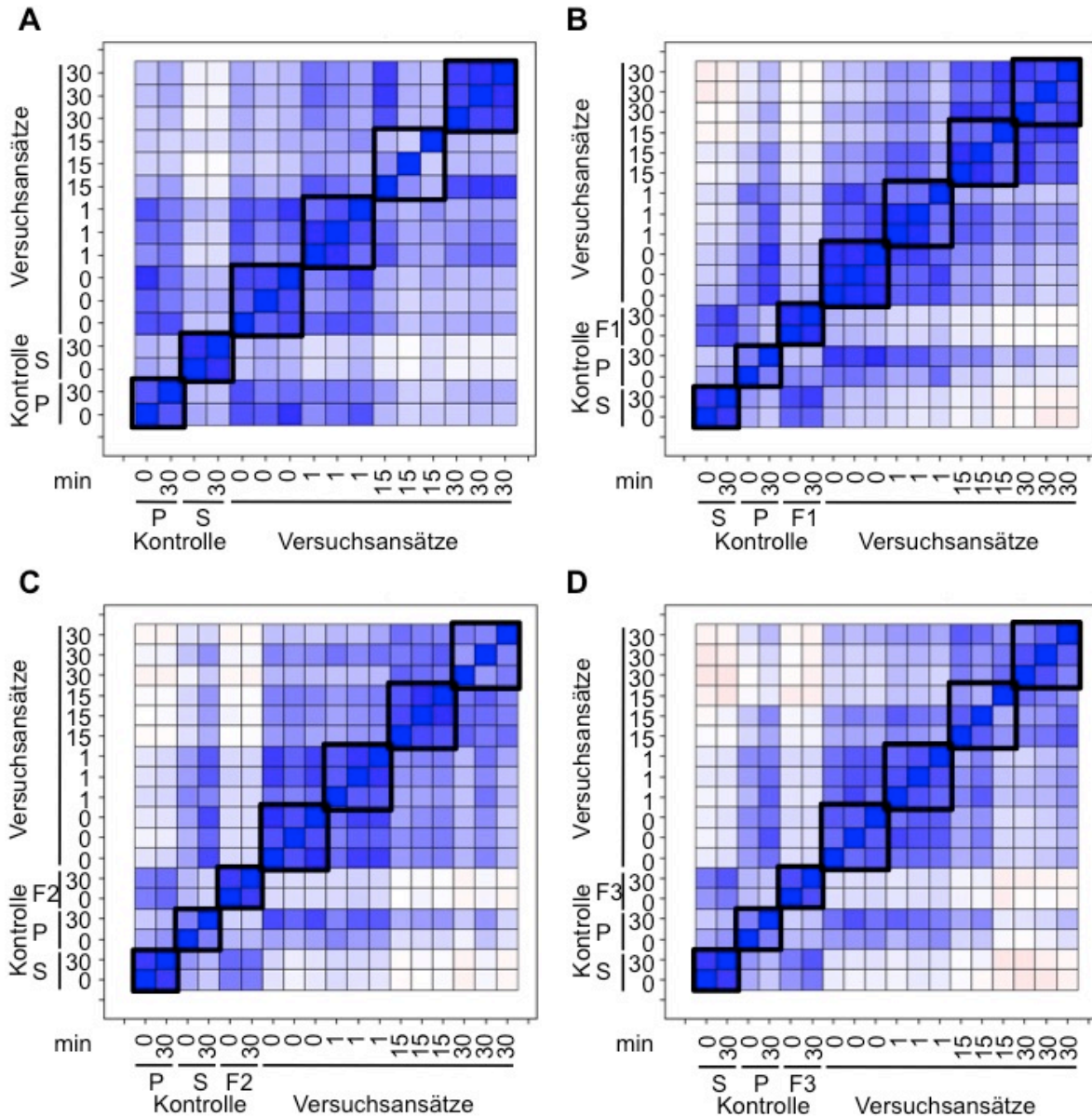
Von der Protease DegP wurden 1,5  $\mu$ M, von den Faltungshelfern DsbAPT, PpiD und SurA je 7,5  $\mu$ M und von dem in 8 M Urea denaturierten Substrat EfeB wurden 5  $\mu$ M im Degradationsassay eingesetzt. Die Proben wurden bei 37 °C in LEW-Puffer pH 8 mit einer Konzentration von 1 M Urea für 30 min unter schütteln inkubiert. Die Kontrollen wurden in einfacher Ausführung, die Reaktionsansätze in Triplikaten angesetzt. Proben wurden zu den definierten Zeitpunkten 0 min und 30 min genommen und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert. Von allen Proben wurden jeweils 10  $\mu$ l aufgetragen und es wurde ein Größenstandard (M) verwendet. **(A)** zeigt die Kontrollen EfeB, DegP, DsbAPT und das Tripliket an Reaktionsansätzen mit DegP, EfeB und DsbAPT, sowie die PpiD-Kontrolle. **(B)** zeigt das Tripliket an Reaktionsansätzen mit DegP, EfeB und PpiD, die SurA-Kontrolle und das Tripliket an Reaktionsansätzen mit DegP, EfeB und SurA.

Abbildung 3.30 zeigt die DegP-Degradationsassays, bei denen jeweils 1,5  $\mu$ M der Serinprotease DegP, 5  $\mu$ M des Substrats EfeB und jeweils 7,5  $\mu$ M einer der

Faltungshelfer DsbAPT, PpiD oder SurA eingesetzt wurde. Unter **(A)** sind die Kontrollen EfeB, DegP, DsbAPT und das Triplikot an Reaktionsansätzen mit DegP, EfeB und DsbAPT, sowie die PpiD-Kontrolle dargestellt. **(B)** zeigt das Triplikot an Reaktionsansätzen mit DegP, EfeB und PpiD, die SurA-Kontrolle und das Triplikot an Reaktionsansätzen mit DegP, EfeB und SurA. Bei den Reaktionsansätzen mit den Faltungsfaktoren DsbAPT und PpiD ist nach 30 Minuten ein Abbau des Substrats EfeB durch die Protease DegP zu erkennen. Im Fall von SurA wird das Substrat EfeB durch den Faltungshelfer SurA im SDS-Gel überlagert und lässt deshalb keine Aussage über die Degradation des Substrats durch DegP zu. Neben den in der SDS-PAGE analysierten Zeitpunkten von 0 min und 30 min wurden nach 1 min und 15 min ebenfalls Proben entnommen. Bei der massenspektrometrischen Analyse der Peptidfragmente wurden alle vier Zeitpunkte berücksichtigt. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme des Tools *Utilities for Mass Spectrometry Analysis of Proteins* (UMSAP) von Dr. Kenny Bravo-Rodriguez (Bravo-Rodriguez *et al.*, 2018). Zunächst wurden durch das Programm UMSAP die Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die einzelnen DegP-Degradationsversuche berechnet. Proben die bei  $c$  einen Wert kleiner 0,5 aufwiesen, wurden bei der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Abbildung 3.31 zeigt die Zusammenfassung aller Korrelationskoeffizienten. Unter **(A)** sind die Korrelationen des DegP-Degradationsassays ohne Faltungshelfer gezeigt. Die anderen Abbildungsteile zeigen die DegP-Degradationsassays mit den Faltungshelfern DsbAPT **(B)**, PpiD **(C)** und SurA **(D)**. Die Kontrollen sind in einfacher Ausführung zum Zeitpunkt 0 und 30 min aufgeführt. Dabei ist (P) die Protease, (S) das Substrat und die Faltungshelfer DsbAPT (F1), PpiD (F2) und SurA (F3). Die Versuchsansätze sind als Triplets zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 15 min und 30 min angegeben. Die dunkelblaue Diagonale ergibt sich durch die perfekte Korrelation jeder Probe mit sich selber und dadurch einem  $c=1$ . Je heller die Blaufärbung, desto geringer ist die Korrelation. Die schwarzen Kästchen schließen jeweils die relevanten Werte ein.

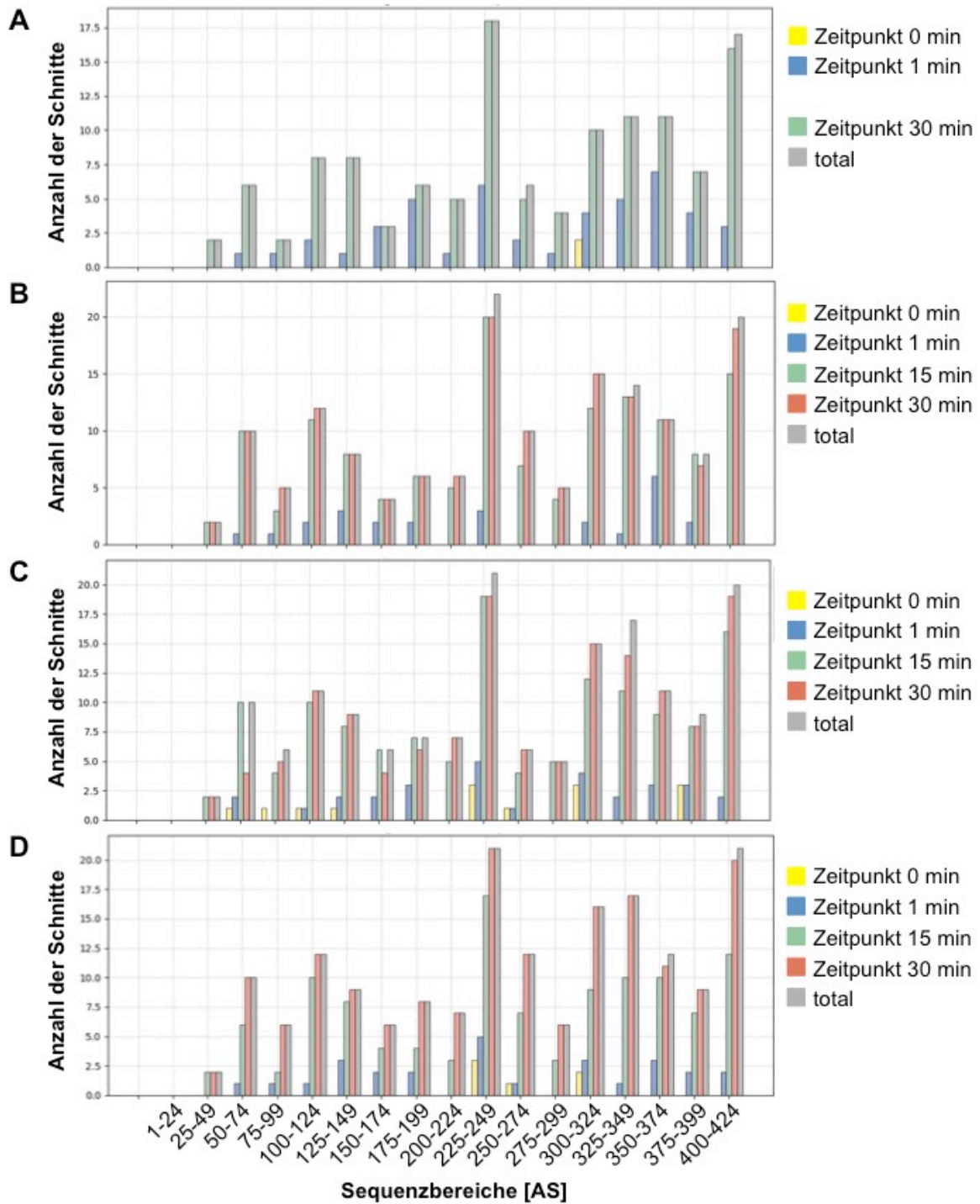
Bei dem DegP-Degradationsassay ohne Faltungshelfer (Abbildung 3.31 **(A)**) wird zum Beispiel bei den Werten zum Zeitpunkt 15 min deutlich, dass hier keine ausreichende Korrelation der Werte vorliegt und daher der komplette Datensatz zum Zeitpunkt 15 min bei der weiterführenden Auswertung ausgeschlossen wird. Bei dem Verdau von EfeB mit der Protease DegP und der Zugabe von DsbAPT **(B)** wiesen alle Werte ein  $c > 0,5$  auf. Der proteolytische Verdau von EfeB durch DegP mit dem Faltungshelfer PpiD **(C)** wies ebenfalls gute Korrelationen auf. Hier wurde lediglich

die zweite Probe des 30 min Triplets bei der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Bei dem Verdau von EfeB durch DegP mit dem Faltungshelfer SurA (D) wurden sowohl bei dem Triplet zum Zeitpunkt 15 min als auch bei dem Triplet zum Zeitpunkt 30 min der dritte Wert bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.



**Abbildung 3.31: Korrelationskoeffizienten nach Pearson für DegP-Degradationsassays**

Unter (A) sind die Korrelationen des DegP-Degradationsassays ohne Faltungshelfer gezeigt. Die anderen Abbildungsteile zeigen Korrelationskoeffizienten der DegP-Degradationsassays mit den Faltungshelfern DsbAPT (B), PpiD (C) und SurA (D). Die Kontrollen sind in einfacher Ausführung zum Zeitpunkt 0 und 30 min aufgeführt. Dabei ist (P) die Protease DegP, (S) das Substrat EfeB und die Faltungshelfer DsbAPT (F1), PpiD (F2) und SurA (F3). Die Versuchsansätze sind als Triplets zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 15 min und 30 min angegeben. Die dunkelblaue Diagonale ergibt sich durch die perfekte Korrelation jeder Probe mit sich selber und dadurch einem  $c=1$ . Je heller die Blaufärbung, desto geringer ist die Korrelation. Die schwarzen Kästchen schließen jeweils die relevanten Werte ein.



**Abbildung 3.32: Schnitte durch die Protease DegP über die native Sequenz von EfeB**

Die native Sequenz von EfeB wurde in Abschnitte von 25 Aminosäuren (AS) unterteilt und gegen die Anzahl der Schnitte durch die Protease DegP in dem jeweiligen Sequenzbereich aufgetragen. Bei der Proteolyse von EfeB durch DegP ohne Faltungshelfer ist die Anzahl der Schnitte zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min und 30 min angegeben (A). Bei den Verdauen von EfeB durch DegP mit Zugabe der Faltungshelfer DsbAPT (B), PpiD (C) und SurA (D) ist die Anzahl der Schnitte jeweils zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 15 min und 30 min angegeben. In jedem Abbildungsteil (A-D) ist unter (total) die Gesamtheit aller Schnitte in dem jeweiligen Sequenzbereich angegeben.

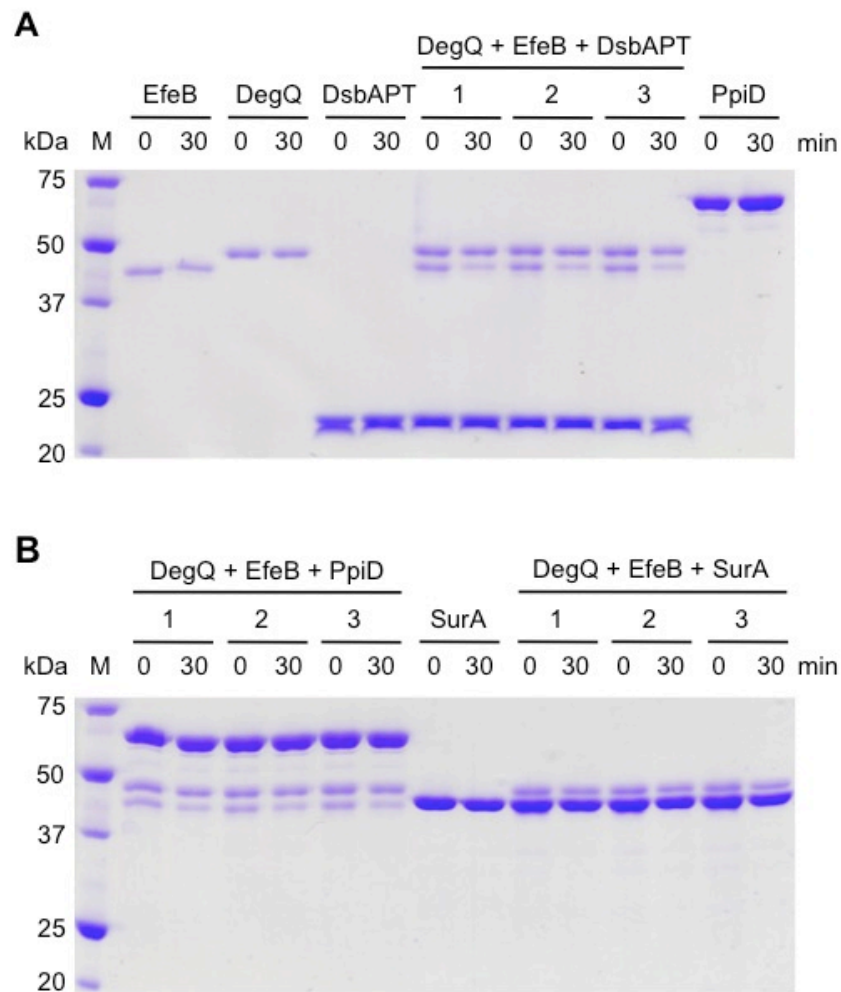
Durch den Vergleich des Verdauens von EfeB durch die Protease DegP mit den jeweiligen Verdauen unter Zugabe der einzelnen Faltungshelfer fällt auf, dass bei

keinem der drei Faltungshelfer eine nennenswerte Protektion des denaturierten Substrats zu erkennen ist (Abbildung 3.32). Die Protektionen in den einzelnen Sequenzbereichen sind nur marginal. DsbAPT (**B**) weist mit einer sehr schwachen Protektion über zwei große Sequenzbereiche (175-349 Aminosäuren (AS) und 375-424 AS) noch die stärkste Protektion vor der Proteolyse durch die Protease DegP auf. Bei PpiD (**C**) ist in dem Sequenzbereich von EfeB bei 275-299 AS eine ganz leichte Protektion zu erkennen und bei SurA (**D**) in den Bereichen 200-224 AS, 275-299 AS und 325-349 AS.

### 3.4.2.2 DegQ-Degradationsassays mit verschiedenen Faltungshelfern

Die Durchführung der Degradationsassays ist unter 2.4.10 genau beschrieben. Die entnommenen Proben wurden wie unter 2.4.11 beschrieben mit Aceton gefällt und die entstandenen Peptidfragmente im Anschluss massenspektrometrisch analysiert (2.4.12.2).

Abbildung 3.33 zeigt die DegQ-Degradationsassays, bei denen jeweils 1,5 µM der Serinprotease DegQ, 5 µM des Substrats EfeB und jeweils 7,5 µM einer der Faltungshelfer DsbAPT, PpiD oder SurA eingesetzt wurde. Unter (**A**) sind die Kontrollen EfeB, DegQ, DsbAPT und das Triplikot an Reaktionsansätzen mit DegQ, EfeB und DsbAPT, sowie die PpiD-Kontrolle dargestellt. (**B**) zeigt das Triplikot an Reaktionsansätzen mit DegQ, EfeB und PpiD, die SurA-Kontrolle und das Triplikot an Reaktionsansätzen mit DegQ, EfeB und SurA. Bei den Reaktionsansätzen mit dem Faltungsfaktor DsbAPT ist nach 30 Minuten ein deutlicher Abbau des Substrats EfeB durch die Protease DegQ zu erkennen. Bei PpiD ist ebenfalls ein Abbau zu erkennen, allerdings fällt dieser etwas geringer aus. Im Fall von SurA wird das Substrat EfeB durch den Faltungshelfer SurA im SDS-Gel überlagert und lässt deshalb keine Aussage über die Degradation des Substrats durch DegQ zu. Neben den in der SDS-PAGE analysierten Zeitpunkten von 0 min und 30 min wurden nach 1 min und 15 min ebenfalls Proben entnommen. Bei der massenspektrometrischen Analyse der Peptidfragmente wurden alle vier Zeitpunkte berücksichtigt. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme des Tools UMSAP von Dr. Kenny Bravo-Rodriguez (Bravo-Rodriguez *et al.*, 2018). Zunächst wurden durch das Programm UMSAP die Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die einzelnen DegP-Degradationsversuche berechnet. Proben die bei c einen Wert kleiner 0,5 aufwiesen, wurden bei der weiteren Auswertung ausgeschlossen.



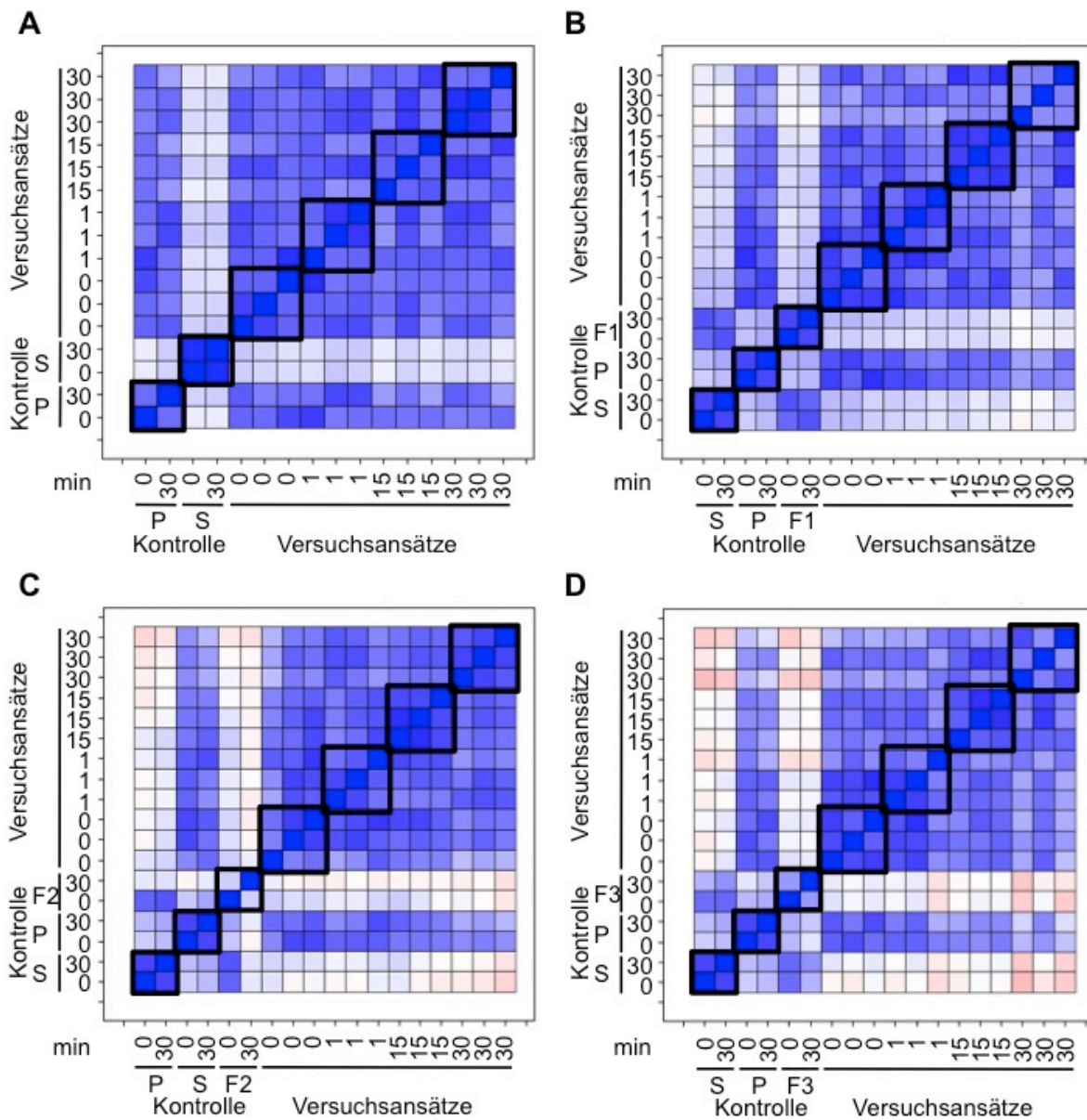
**Abbildung 3.33: Einsatz von Faltungshelfern im DegQ-Degradationsassay**

Von der Protease DegQ wurden 1,5  $\mu$ M, von den Faltungshelfern DsbAPT, PpiD und SurA je 7,5  $\mu$ M und von dem in 8 M Urea denaturierten Substrat EfeB wurden 5  $\mu$ M im Degradationsassay eingesetzt. Die Proben wurden bei 37 °C in Propionsäurepuffer pH 5,5 mit einer Konzentration von 1,5 M Urea für 30 min unter Schütteln inkubiert. Die Kontrollen wurden in einfacher Ausführung, die Reaktionsansätze in Triplikaten angesetzt. Proben wurden zu den definierten Zeitpunkten 0 min und 30 min genommen und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert. Von allen Proben wurden jeweils 10  $\mu$ l aufgetragen und es wurde ein Größenstandard (M) verwendet. **(A)** zeigt die Kontrollen EfeB, DegQ, DsbAPT und das Tripliket an Reaktionsansätzen mit DegQ, EfeB und DsbAPT, sowie die PpiD-Kontrolle. **(B)** zeigt das Tripliket an Reaktionsansätzen mit DegQ, EfeB und PpiD, die SurA-Kontrolle und das Tripliket an Reaktionsansätzen mit DegQ, EfeB und SurA.

Abbildung 3.34 zeigt die Zusammenfassung aller Korrelationskoeffizienten. Unter **(A)** sind die Korrelationen des DegQ-Degradationsassays ohne Faltungshelfer gezeigt. Die anderen Abbildungsteile zeigen die DegQ-Degradationsassays mit den Faltungshelfern DsbAPT **(B)**, PpiD **(C)** und SurA **(D)**. Die Kontrollen sind in einfacher Ausführung zum Zeitpunkt 0 und 30 min aufgeführt. Dabei ist (P) die Protease, (S) das Substrat und die Faltungshelfer DsbAPT (F1), PpiD (F2) und SurA (F3). Die Versuchsansätze sind als Triplets zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 15 min und 30 min angegeben. Die dunkelblaue Diagonale ergibt sich durch die perfekte Korrelation

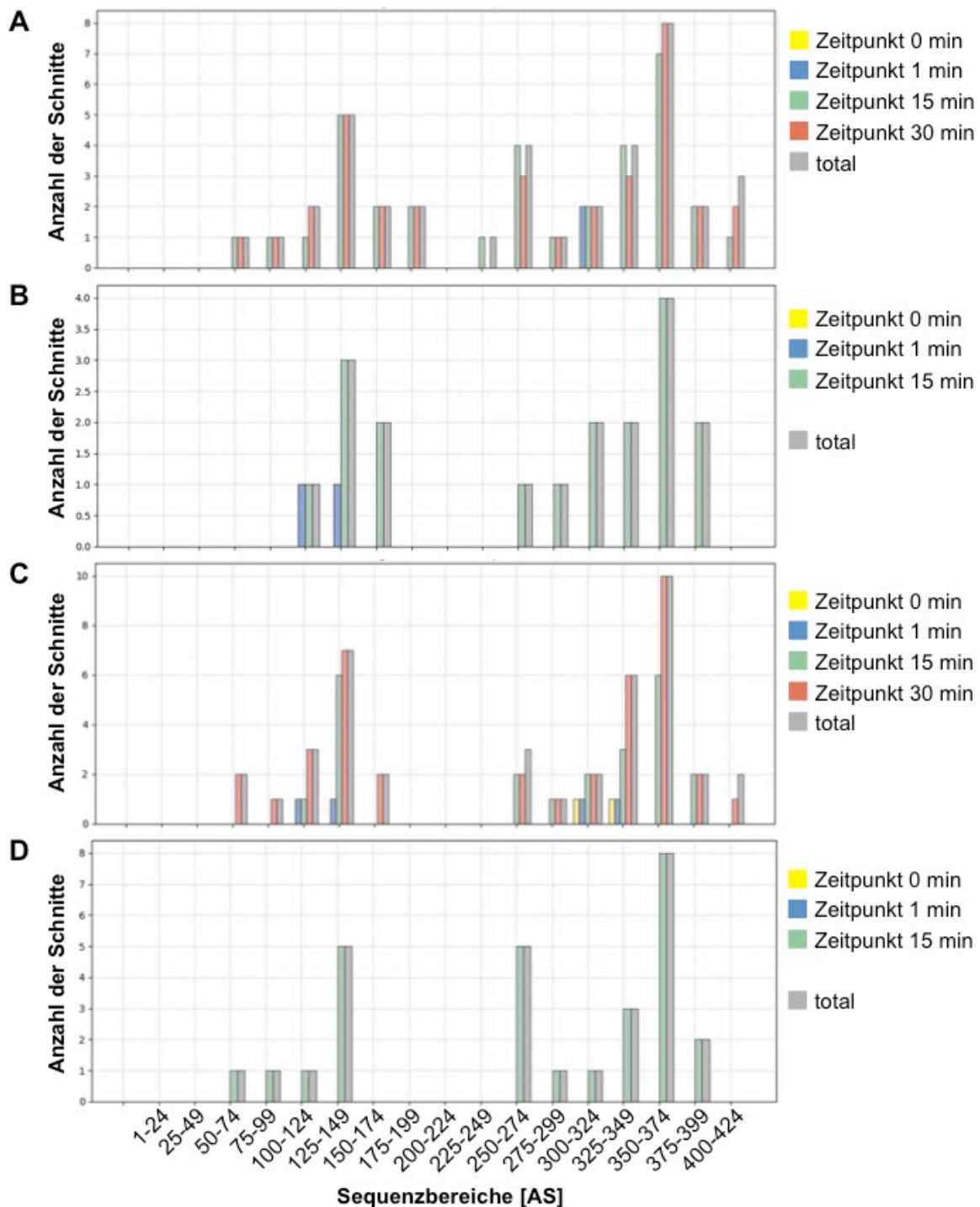


jeder Probe mit sich selber und dadurch einem  $c=1$ . Je heller die Blaufärbung, desto geringer ist die Korrelation. Die schwarzen Kästchen schließen jeweils die relevanten Werte ein.



**Abbildung 3.34: Korrelationskoeffizienten nach Pearson für DegQ-Degradationsassays**

Unter (A) sind die Korrelationen des DegQ-Degradationsassays ohne Faltungshelfer gezeigt. Die anderen Abbildungsteile zeigen Korrelationskoeffizienten der DegQ-Degradationsassays mit den Faltungshelfern DsbAPT (B), PpiD (C) und SurA (D). Die Kontrollen sind in einfacher Ausführung zum Zeitpunkt 0 und 30 min aufgeführt. Dabei ist (P) die Protease DegQ, (S) das Substrat EfeB und die Faltungshelfer DsbAPT (F1), PpiD (F2) und SurA (F3). Die Versuchsansätze sind als Triplets zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 15 min und 30 min angegeben. Die dunkelblaue Diagonale ergibt sich durch die perfekte Korrelation jeder Probe mit sich selber und dadurch einem  $c=1$ . Je heller die Blaufärbung, desto geringer ist die Korrelation. Die schwarzen Kästchen schließen jeweils die relevanten Werte ein.



**Abbildung 3.35: Schnitte durch die Protease DegQ über die native Sequenz von EfeB**

Die native Sequenz von EfeB wurde in Abschnitte von 25 Aminosäuren (AS) unterteilt und gegen die Anzahl der Schnitte durch die Protease DegQ in dem jeweiligen Sequenzbereich aufgetragen. Bei der Proteolyse von EfeB durch DegQ ohne Faltungshelfer ist die Anzahl der Schnitte zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 15 min und 30 min angegeben (A). Ebenso bei dem Verdau von EfeB durch DegQ mit Zugabe des Faltungshelfers PpiD (C). Unter Zugabe der Faltungshelfer DsbAPT (B), und SurA (D) ist die Anzahl der Schnitte jeweils zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min und 15 min angegeben. In jedem Abbildungsteil (A-D) ist unter (total) die Gesamtheit aller Schnitte in dem jeweiligen Sequenzbereich angegeben.

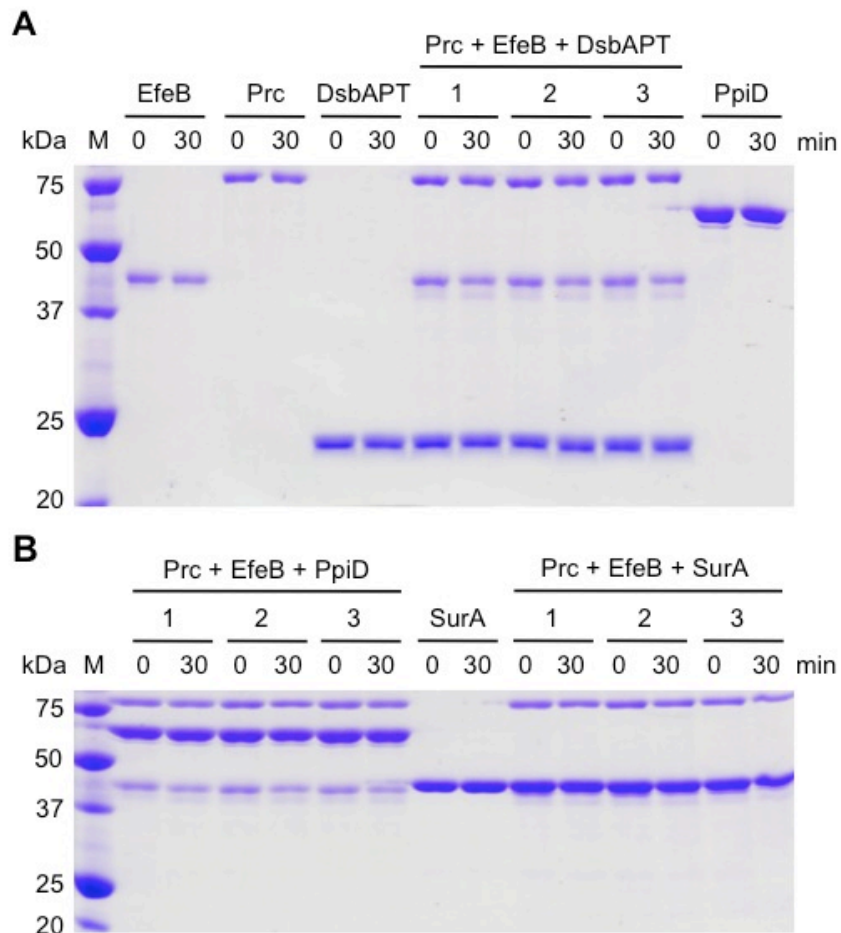
Bei dem DegQ-Degradationsassay ohne Faltungshelfer (Abbildung 3.34 **(A)**) wiesen alle Werte ein  $c > 0,5$  auf. Bei dem Verdau von EfeB mit der Protease DegQ und der Zugabe von DsbAPT **(B)**, sowie bei der Zugabe von SurA **(D)** wiesen die Proben zum Zeitpunkt 30 min keine ausreichende Korrelation auf. Daher wurde der komplette Datensatz zum Zeitpunkt 30 min bei der weiterführenden Auswertung ausgeschlossen. Der proteolytische Verdau von EfeB durch DegQ mit dem Faltungshelfer PpiD **(C)** wies ebenfalls gute Korrelationen auf. Hier wurde lediglich die erste Probe des Triplets zum Zeitpunkt 0 min bei der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Beim Vergleich des Verdauens von EfeB durch die Protease DegQ mit den jeweiligen Verdauen unter Zugabe der einzelnen Faltungshelfer ist eine deutliche Protektion des denaturierten Substrats zu erkennen. DsbAPT (Abbildung 3.35 **(B)**) zeigt in vier Sequenzbereichen (50-99 AS, 175-199 AS, 225-249 AS und 400-224 AS) eine absolute Protektion. In diesen Bereichen kommt es über den gesamten zeitlichen Verlauf des Degradationsassays zu keinen Schnitten im Substrat EfeB durch die Protease DegQ. Desweiteren wurden die Bereiche 250-274 AS und 350-374 AS protektiert, da hier die Anzahl der Schnitte um  $\frac{1}{4}$  bzw.  $\frac{1}{2}$  reduziert wurde. Bei PpiD (Abbildung 3.35 **(C)**) ist in den beiden Sequenzbereichen bei 175-199 AS und 225-249 AS eine vollständige Protektion zu erkennen. In den Bereichen 150-174 AS, 250-274 AS und 400-424 AS wurde das Substrat ebenfalls protektiert, allerdings lag hier nur eine Reduktion der Schnittanzahl oder eine Verzögerung bis zum Erreichen der Schnittanzahl vor. Auch durch SurA (Abbildung 3.35 **(D)**) kommt es zur vollständigen Protektion des Substrats in den AS-Bereichen 150-199, 225-249 und 400-424. Eine leichte Protektion konnte durch die Reduktion der Schnittanzahl zusätzlich in dem Bereich 300-324 AS festgestellt werden.

### 3.4.2.3 Prc-Degradationsassays mit verschiedenen Faltungshelfern

Die Durchführung der Degradationsassays ist unter 2.4.10 genau beschrieben. Die entnommenen Proben wurden wie unter 2.4.11 beschrieben mit Aceton gefällt und die entstandenen Peptidfragmente im Anschluss massenspektrometrisch analysiert (2.4.12.2). Abbildung 3.36 zeigt die Prc-Degradationsassays, bei denen jeweils  $1,5 \mu\text{M}$  der Serinprotease Prc,  $5 \mu\text{M}$  des Substrats EfeB und jeweils  $7,5 \mu\text{M}$  einer der Faltungshelfer DsbAPT, PpiD oder SurA eingesetzt wurde. Unter **(A)** sind die Kontrollen EfeB, Prc, DsbAPT und das Triplikat an Reaktionsansätzen mit Prc, EfeB und DsbAPT, sowie die PpiD-Kontrolle dargestellt. **(B)** zeigt das Triplikat an

Reaktionsansätzen mit Prc, EfeB und PpiD, die SurA-Kontrolle und das Triplikate an Reaktionsansätzen mit Prc, EfeB und SurA. Bei den Reaktionsansätzen mit den Faltungsfaktoren DsbAPT und PpiD ist nach 30 Minuten ein leichter Abbau des Substrats EfeB durch die Protease DegP zu erkennen. Im Fall von SurA wird das Substrat EfeB durch den Faltungshelfer SurA im SDS-Gel überlagert und lässt deshalb keine Aussage über die Degradation des Substrats durch Prc zu.

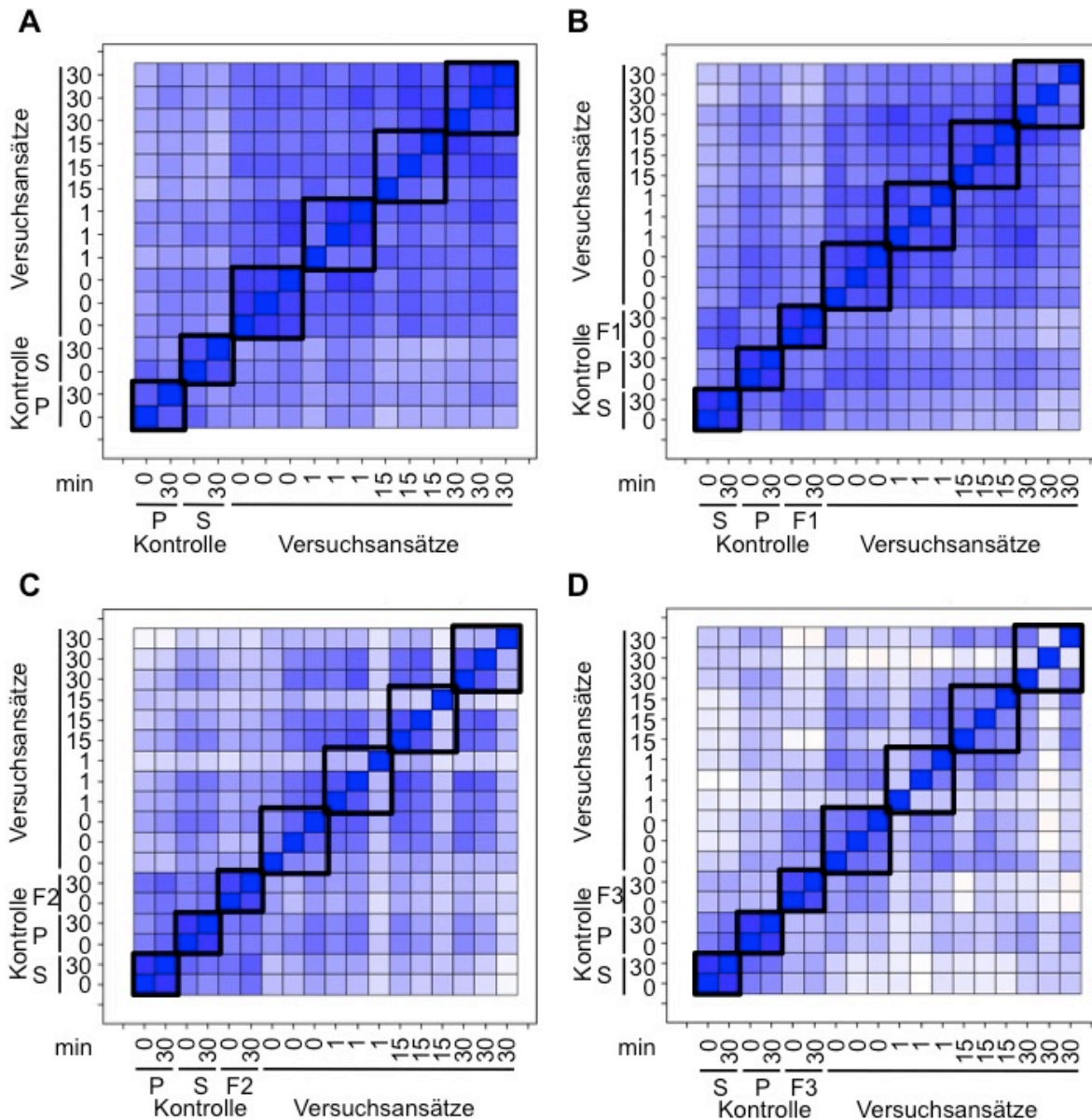


**Abbildung 3.36: Einsatz von Faltungshelfern im Prc-Degradationsassay**

Von der Protease Prc wurden 1,5  $\mu$ M, von den Faltungshelfern DsbAPT, PpiD und SurA je 7,5  $\mu$ M und von dem in 8 M Urea denaturierten Substrat EfeB wurden 5  $\mu$ M im Degradationsassay eingesetzt. Die Proben wurden bei 37  $^{\circ}$ C in LEW-Puffer pH 8 mit einer Konzentration von 1 M Urea für 30 min unter schütteln inkubiert. Die Kontrollen wurden in einfacher Ausführung, die Reaktionsansätze in Triplikaten angesetzt. Proben wurden zu den definierten Zeitpunkten 0 min und 30 min genommen und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert. Von allen Proben wurden jeweils 10  $\mu$ l aufgetragen und es wurde ein Größenstandard (M) verwendet. **(A)** zeigt die Kontrollen EfeB, DegP, DsbAPT und das Triplikate an Reaktionsansätzen mit DegP, EfeB und DsbAPT, sowie die PpiD-Kontrolle. **(B)** zeigt das Triplikate an Reaktionsansätzen mit DegP, EfeB und PpiD, die SurA-Kontrolle und das Triplikate an Reaktionsansätzen mit DegP, EfeB und SurA.

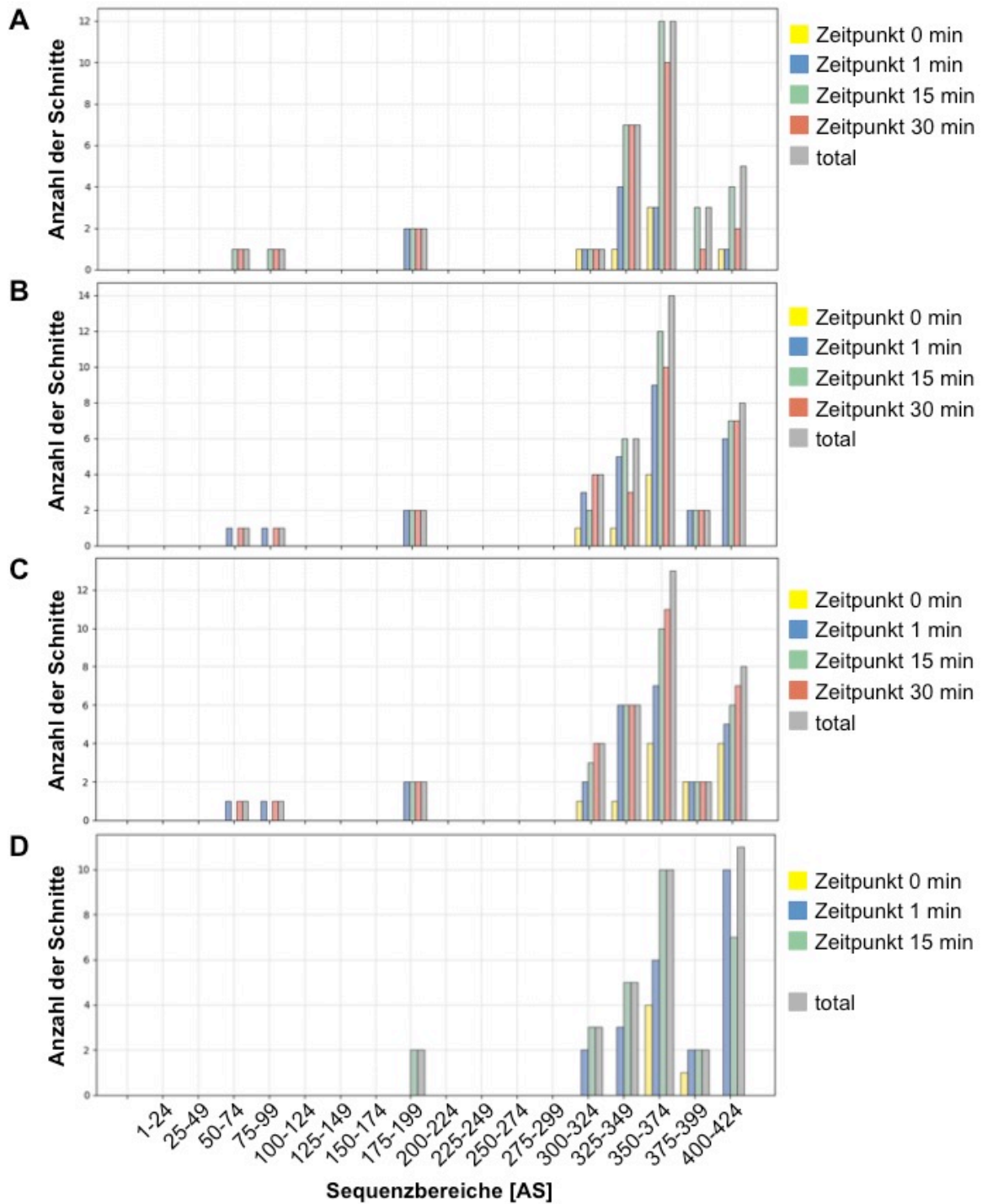
Neben den in der SDS-PAGE analysierten Zeitpunkten von 0 min und 30 min wurden nach 1 min und 15 min ebenfalls Proben entnommen. Bei der massenspektrometrischen Analyse der Peptidfragmente wurden alle vier Zeitpunkte berücksichtigt.

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme des Tools UMSAP von Dr. Kenny Bravo-Rodriguez (Bravo-Rodriguez *et al.*, 2018). Zunächst wurden durch das Programm UMSAP die Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die einzelnen Prc-Degradationsversuche berechnet. Proben die bei c einen Wert kleiner 0,5 aufwiesen, wurden bei der weiteren Auswertung ausgeschlossen.



**Abbildung 3.37: Korrelationskoeffizienten nach Pearson für Prc-Degradationsassays**

Unter (A) sind die Korrelationen des DegP-Degradationsassays ohne Faltungshelfer gezeigt. Die anderen Abbildungsteile zeigen Korrelationskoeffizienten der DegP-Degradationsassays mit den Faltungshelfern DsbAPT (B), PpiD (C) und SurA (D). Die Kontrollen sind in einfacher Ausführung zum Zeitpunkt 0 und 30 min aufgeführt. Dabei ist (P) die Protease DegP, (S) das Substrat EfeB und die Faltungshelfer DsbAPT (F1), PpiD (F2) und SurA (F3). Die Versuchsansätze sind als Tripletts zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 15 min und 30 min angegeben. Die dunkelblaue Diagonale ergibt sich durch die perfekte Korrelation jeder Probe mit sich selber und dadurch einem  $c=1$ . Je heller die Blaufärbung, desto geringer ist die Korrelation. Die schwarzen Kästchen schließen jeweils die relevanten Werte ein.



**Abbildung 3.38: Schnitte durch die Protease Prc über die native Sequenz von EfeB**

Die native Sequenz von EfeB wurde in Abschnitte von 25 Aminosäuren (AS) unterteilt und gegen die Anzahl der Schnitte durch die Protease DegP in dem jeweiligen Sequenzbereich aufgetragen. Bei der Proteolyse von EfeB durch DegP ohne Faltungshelfer ist die Anzahl der Schnitte zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min und 30 min angegeben (A). Bei den Verdauen von EfeB durch DegP mit Zugabe der Faltungshelfer DsbAPT (B), PpiD (C) und SurA (D) ist die Anzahl der Schnitte jeweils zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 15 min und 30 min angegeben. In jedem Abbildungsteil (A-D) ist unter (total) die Gesamtheit aller Schnitte in dem jeweiligen Sequenzbereich angegeben.

Abbildung 3.37 zeigt die Zusammenfassung aller Korrelationskoeffizienten wie unter 3.4.2.1 beschrieben. Bei dem Prc-Degradationsassay ohne Faltungshelfer (**A**) wiesen alle Werte ein  $c > 0,5$  auf. Ebenso bei dem Verdau von EfeB mit der Protease Prc und der Zugabe von DsbAPT (**B**). Der proteolytische Verdau von EfeB durch Prc mit dem Faltungshelfer PpiD (**C**) wies teilweise schlechtere Korrelationen auf. Hier wurden die erste Probe des Triplets zum Zeitpunkt 0 min und jeweils die dritte Probe zum Zeitpunkt 1 min, 15 min und 30 min bei der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Bei dem Verdau von EfeB durch DegP mit dem Faltungshelfer SurA (**D**) wurden die schlechtesten Korrelationskoeffizienten bestimmt. Hier wurde die erste Probe des Triplets zum Zeitpunkt 1 min, die dritte Probe des Triplets zum Zeitpunkt 15 min, sowie der komplette Datensatz zum Zeitpunkt 30 min bei der weiterführenden Auswertung ausgeschlossen.

Durch den Vergleich des Verdaues von EfeB durch die Protease Prc mit den jeweiligen Verdauen unter Zugabe der einzelnen Faltungshelfer fällt auf, dass bei den beiden Faltungshelfern DsbAPT und PpiD keine nennenswerte Protektion des denaturierten Substrats zu erkennen ist (Abbildung 3.38 (**A**, **B** und **C**)). Nur bei der Zugabe des Faltungshelfers SurA (**D**) konnte eine Protektion gemessen werden. Im Bereich 50-99 AS lag eine vollständige Protektion vor, da keine Schnitte mehr stattgefunden haben. Im Bereich 175-199 AS wurde das Substrat leicht protektiert, da Prc hier erst nach 15 min statt nach 1 min geschnitten hat.

### **3.4.3 Protektionsmuster der Faltungsfaktoren in den Degradationsassays**

In Abbildung 3.39 sind die Protektionsmuster der Faltungsfaktoren im Hinblick auf das denaturierte Substrat EfeB im Verdau mit den drei Serinproteasen DegP, DegQ und Prc dargestellt. EfeB ist 423 AS lang, wobei die ersten 35 AS die Signalsequenz für den Transport ins Periplasma darstellen und im Verlauf der Translokation abgespalten. Das Protein weist mit Signalsequenz vier Cysteine, im reifen Zustand drei Cysteine auf, die potentiell Disulfidbrücken ausbilden könnten. Wie unter 3.4.2 beschrieben, wurde die Sequenz in Abschnitte von 25 AS Länge unterteilt und die Bereiche der Protektion des Substrats EfeB durch die drei Faltungshelfer DsbAPT, PpiD und SurA graphisch dargestellt (Abbildung 3.39). Das Ausmaß der Protektion ist dabei durch X-XXX codiert. Ein X bedeutet, die Protektion ist sehr gering und kaum erkennbar.





Bei XX liegt eine deutliche Protektion vor, die sich entweder in der Reduktion der Schnittanzahlen oder durch eine zeitliche Verzögerung der Schnitte darstellt. Ist die Protektion mit XXX angegeben, wurden in diesem Bereich überhaupt keine Schnitte mehr gefunden. Es fand also eine komplette Protektion dieses Bereichs statt.

In den DegP-Degradationsassays wurde das denaturiert vorliegende Substrat EfeB von den drei Faltungsfaktoren nur geringfügig protektiert und wenn nur im hinteren Bereich der Aminosäuresequenz. Bei der Protease DegQ wurde das Substrat durch die Faltungsfaktoren sehr deutlich protektiert. Häufig wurden hier Bereiche komplett protektiert, es fanden also überhaupt keine Schnitte mehr statt. Die Bereiche 175-199 AS, 225-249 AS und 400-424 AS wurden dabei von allen drei Faltungshelfern sehr stark protektiert. Auch im vorderen Bereich bei 50-99 AS konnte durch die Faltungshelfer DsbAPT und PpiD eine Protektion des Substrats vor der Proteolyse durch DegQ bestimmt werden. Bei der Proteolyse durch Prc wies nur die Prolinisomerase SurA eine Protektion des Substrats auf. Diese beschränkte sich auf Abschnitte im vorderen Bereich der Aminosäuresequenz.

## 4 Diskussion

Da die Umweltbedingungen des Lebensraumes von *E. coli* großen Schwankungen unterliegen, strebt die Zelle die Aufrechterhaltung bestmöglicher Wachstumsbedingungen an. Vor allem das Periplasma ist aufgrund der Zellarchitektur diesen Schwankungen, wie Veränderungen der Temperatur, der Osmolarität oder pH-Werten, in höherem Maße ausgesetzt. Durch die Änderungen der Umweltbedingungen werden der Faltungszustand und die Funktionalität von periplasmatischen Proteinen, sowie die Integrität der Zellhülle beeinflusst.

Durch den Mechanismus der Proteinqualitätskontrolle wird der Proteinfaltungszustand permanent kontrolliert. Selbst unter optimalen Wachstumsbedingungen ist die Proteinqualitätskontrolle überlebensnotwendig. Bei widrigen Bedingungen gewinnt die Proteinqualitätskontrolle zunehmend an Wichtigkeit, da die Reparatur oder Degradation der periplasmatischen Proteine unterstützt und somit der Zelltod verhindert wird (siehe 1.3). In der Zelle kommen verschiedene Chaperone, Faltungshelfer und Proteasen (siehe 1.4) zum Einsatz, um die Aggregation fehlgefalteter Proteine zu verhindern, fehlgefaltete Proteine und bereits vorhandene Aggregate abzubauen.

### 4.1 Organisation des Netzwerks der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle

Erste Erkenntnisse zur Organisation von periplasmatischen Faltungsfaktoren erlangten Rizzitello *et al.* durch die Herstellung synthetisch letaler Phänotypen. Anhand Deletionsstudien wurden letale Kombinationen für Nullmutationen in *surA* und *degP*, sowie *surA* und *skp* gefunden. Im Gegensatz zu diesen beiden synthetisch letalen Phänotypen, war die *skp degP*-Doppelmutante gänzlich unauffällig. Aus diesen Ergebnissen folgerten Rizzitello *et al.*, dass es sich bei SurA und DegP bzw. Skp um redundante Faktoren handelt, die in zwei unterschiedlichen Faltungswegen organisiert sein müssen (Rizzitello *et al.*, 2001).

Ausgehend von dieser Theorie führten Weski und Ehrmann weiterführende Studien durch, um neue Erkenntnisse zur Organisation der Faltungsfaktoren zu erhalten. Es wurden zunächst jeweils zwei gut untersuchte, nicht essentielle, periplasmatische

Faltungsfaktoren in verschiedenen Kombinationen in *E. coli* deletiert. Diese Doppel-KO-Stämme wurden dann unter optimalen, sowie unter Faltungsstress-assoziierten Wachstumsbedingungen hinsichtlich der resultierenden synthetischen Phänotypen charakterisiert. Dabei wurden Hinweise darauf geliefert, dass die Proteinqualitätskontrolle nicht in starren Wegen, sondern vielmehr in Form eines flexiblen Netzwerks organisiert ist (Weski, 2010; Weski und Ehrmann, 2012). Basierend auf dieser Theorie sollte die Organisation des Netzwerks der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle im Rahmen dieser Arbeit weiterführend untersucht werden, um neue Erkenntnisse zu erlangen und erste Hypothesen zu bestätigen. Es wurden für die Untersuchungen dieser Arbeit sieben Doppel-KO-Stämme (*degP dsbA*, *degP tsp*, *degP yfgC*, *degP ppiD*, *surA dsbA*, *surA ptrA* und *surA yfgC*) ausgewählt, die anscheinend Unregelmäßigkeiten mit Außenmembranproteinen auf Proteinebene aufweisen. Jeweils einer der deletierten Faltungsfaktoren wurde unter Wachstumsbedingungen, die mit Faltungsstress assoziiert werden, rekonstitutiv exprimiert. Die durch extrachromosomale Expression gereinigten Proteine wurden massenspektrometrisch analysiert und dadurch potentiell daran gebundene Substrate detektiert.

## 4.2 Schlüsselspieler und Enzyme mit enger Substratspezifität

Es konnten für jeden in dieser Arbeit untersuchten Faltungshelfer mittels massenspektrometrischer Analysen gebundene potentielle Substrate detektiert werden. Die Anzahl der Substrate variierte dabei stark.

An der inaktiven Serinprotease DegPSA wurden bei Reinigungen aus den drei Doppel-KO-Stämmen JB26 (*degP ppiD*), JB48 (*degP dsbA*) und JB53 (*degP tsp*) zwischen 36 und 90 gebundene Proteine detektiert. Ebenfalls eine große Anzahl an potentiellen Bindungspartnern wies die Oxidoreduktase DsbA auf. An diesem Protein waren zwischen 40 und 74 Substrate gebunden. Der erwartete Effekt, dass an der Mutante DsbAPT eine höhere Anzahl an Substraten gebunden wird, blieb aus. Es folgten SurA, PrcSA und DegQSA, die jeweils etwa 30 Substrate gebunden hatten. Deutlich weniger Substrate wurden bei der Reinigung von BepAEQ (19), PtrAEQ (13) und PpiD (11) detektiert. Bei DegP handelt es sich prinzipiell um ein sehr wichtiges Protein der Qualitätskontrolle, welches durch seine Doppelfunktion als Chaperon und

Protease maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit der Zelle beiträgt. Schon 1997 wurde bestätigt, dass DegP bei vielen biochemischen Veränderungen des Umgebungsmediums der Zelle essentiell ist (Pallen und Wren, 1997). Ein weiteres Indiz für den hohen Stellenwert der Serinprotease DegP ist die Tatsache, dass dieses Protein sogar durch zwei Signalsysteme der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle, den  $\sigma^E$ -abhängigen Signalweg (1.3.1), sowie das Zweikomponentensystem Cpx (1.3.2), reguliert wird. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen durch die hohe Anzahl an Substraten, dass DegP im großen Maßstab in die Proteinqualitätskontrolle involviert ist.

Ein weiteres wichtiges Schlüsselement neben DegP scheint die Oxidoreduktase DsbA darzustellen. Dieses Protein hat ebenfalls sehr viele verschiedene Substrate gebunden. In logischer Konsequenz müssen defekte Proteine rückgefaltet werden und benötigen zum Erreichen ihres nativen Zustands unter Umständen die Bildung von Disulfidbrückenbindungen, wofür DsbA unerlässlich ist. Daneben würde anhand der Anzahl der gebundenen potentiellen Substrate die Serinprotease PrcSA und die Prolinisomerase SurA als Schlüsselement einzustufen sein. Für SurA ist bekannt, dass es an der Faltung, dem Transport und durch den Kontakt zum BAM-Komplex an der Insertation von OMP in die Außenmembran beteiligt ist (Lazar und Kolter, 1996; Rouvière und Gross, 1996; Sklar *et al.*, 2007). Die Expression von *surA* wird bei Faltungsstress durch den  $\sigma^E$ -abhängigen Signalweg hochreguliert. Ausgehend von der Anzahl der gebundenen Substrate können folglich im Rahmen dieser Arbeit die vier Proteine DegP, DsbA, SurA und Prc als Schlüsselemente des Netzwerks der Proteinqualitätskontrolle bezeichnet werden. Diese Ergebnisse sind deckend mit den Ergebnissen einer vorangegangenen Dissertation (Weski, 2010).

Die periplasmatische Serinprotease DegQ, die eine etwa 60%ige Homologie und eine ähnliche Substratspezifität zu DegP aufweist, scheint ebenfalls eine wichtige Rolle in der Proteinqualitätskontrolle übernehmen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Überprüfung der Kompensation extrachromosomal überexprimiertes DegQSA aus *degP*-Mutanten (JB26, JB48 und JB53) gereinigt. DegQ kann anscheinend durch die Bindung von etwa 30 Substraten die Protease DegP zwar nicht vollständig, aber teilweise ersetzen. Auf diese Ergebnisse im Hinblick auf deckungsgleiche Substrate wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

Anhand der Anzahl an gebundenen Substraten sind den beiden Metalloproteasen BepAEQ und PtrAEQ, sowie der Prolinisomerase PpiD eher Nebenrollen in der Proteinqualitätskontrolle zuzuschreiben. Die Vermutung, dass diese Proteine

möglicherweise spezifischer seien und dafür weniger Substrate haben, widerspricht zum Beispiel der Vermutung von Antonoaia *et al.*. Diese Gruppe postulierte die Annahme, dass PpiD eine Vielzahl an Substraten direkt nach der Translokation durch das Sec-Translokon an der periplasmatischen Seite der Innenmembran in Empfang nimmt, die Faltung unterstützt und sie ins Periplasma entlässt (Antonoaia *et al.*, 2008). Stymest und Klappa untersuchten anhand von Modellpeptiden die Substratspezifität von PpiD und stellten die Theorie auf, dass PpiD eine breitere Substratspezifität als SurA aufweist (Stymest und Klappa, 2008). Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte das nicht bestätigt werden, da an PpiD nur 11 Substrate gebunden wurden, davon waren sechs andere Faltungshelfer.

### 4.3 Vernetzung der Proteinqualitätskontrolle

Neben den zwanzig häufigsten Substraten wurden bei einigen Faltungshelfern weitere Substrate gefunden. Bei der weiterführenden Diskussion sind jedoch zunächst nur diese zwanzig Substrate berücksichtigt worden. Die kompletten Ergebnisse sind im Anhang zu finden.

Besonders interessant sind die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, dass Faltungshelfer durchaus gemeinsame Substrate haben. So wurden zum Beispiel bei zwei oder sogar mehreren Faltungshelfern die gleichen Substrate gefunden. Diese Schnittmengen bestätigen die Hypothese, dass die periplasmatische Proteinqualitätskontrolle als flexibles Netzwerk organisiert ist und werden im weiteren Verlauf der Arbeit ausführlicher diskutiert. Ein weiterer Punkt der diese These stützen kann, ist die Tatsache, dass neben potentiellen Substraten auch andere Faltungshelfer an die jeweils untersuchten Faltungshelfer gebunden haben. Dies kann bedeuten, dass der unter den Substraten gefundene Faltungsfaktor wirklich ein Substrat des untersuchten Faltungsfaktors ist und von diesem zum Beispiel gefaltet wird. Es ist aber auch möglich, dass die beiden Faltungsfaktoren gemeinsam an einem Substrat arbeiten. Dies könnte dadurch widerspiegelt werden, indem die Substratschnittmengen genauer untersucht werden und zum Beispiel Substrat X an Enzym Y und an Enzym Z gefunden wird. Eine weitere Möglichkeit wäre die Erweiterung des Substratspektrums durch die Kombination der Faltungsfaktoren wenn zum Beispiel Enzym Z nur dann das Substrat X bindet, wenn dieses gleichzeitig an Enzym Y gebunden ist.

Tabelle 4.1: Vergleich der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen

Die Tabelle fasst die Ergebnisse der einzelnen Faltungshelfer zusammen. Aufgeführt sind die Proteinnamen der Substrate, das Molekulargewicht der Substrate in kDa, die UniProt-Identifikationsnummer. Unter dem jeweiligen untersuchten Faltungshelfer sind die Gennamen der potentiellen Substrate angegeben. Die jeweils 20 nach MS/MS Count am häufigsten gefundenen Substrate sind hier alphabetisch nach ihren Gennamen sortiert. Die rot hinterlegten potentiellen Substrate kamen dabei in allen Reinigungen vor (n), die gelb hinterlegten in einer weniger Reinigungen (n-1) und grün hinterlegte in noch einer Reinigung weniger (n-2). Weiß hinterlegte Substrate wurden nur bei einer Reinigung gefunden. Zusätzlich konnten Faltungshelfer gefunden werden (grau hinterlegt), die zunächst nicht zu den 20 häufigsten Ergebnissen gezählt aber nicht vernachlässigt werden sollen. Die blauen Gennamen bedeuten, dass das zugehörige Protein mindestens eine Disulfidbrücke aufweist.

Proteinname	DegPSA	DegQSA	SurA	DsbA/DsbAPT	PpiD	PrcSA	BepAEQ	PtrAEQ	Masse (kDa)	UniProt
Multidrug efflux pump subunit AcrA		acrA	acrA	acrA			acrA	acrA	42,197	P0AE06
Glucose-1-phosphatase	agp								45,683	P19926
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiA			amiA	amiA			amiA		31,412	P36548
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiB					amiB	amiB			47,985	P26365
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiC			amiC			amiC			45,634	P63883
L-asparaginase 2							ansB		36,851	P00805
Outer membrane protein assembly factor BamA	bamA	bamA	bamA	bamA					90,553	P0A940
Vitamin B12 transporter BtuB	btuB								68,407	P06129
Periplasmic protein CpxP						cpxP			18,965	P0AE85
Blue copper oxidase CueO			cueO			cueO			56,556	P36649
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacA		dacA		dacA					44,444	P0AE82
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacC		dacC							43,609	P08506
Protein DcrB		dcrB							19,787	P0AEE1
Periplasmic serine endoprotease DegP			degP	degP			degP	degP	49,354	P0C0V0
Periplasmic pH-dependent serine endoprotease DegQ	degQ		degQ	degQ					47,205	P39099
Serine endoprotease DegS	degS	degS	degS				degS	degS	37,581	P0AEE3
Periplasmic dipeptide transport protein	dppA								60,294	P23847
Thiol:disulfide interchange protein DsbA	dsbA	dsbA	dsbA		dsbA		dsbA	dsbA	23,105	P0AEG4
Formate dehydrogenase-O major subunit	fdoG	fdoG	fdoG	fdoG		fdoG			112,549	P32176
Ferrichrome-iron receptor	fhuA							fhuA	82,182	P06971
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkpA		fkpA			fkpA	fkpA	fkpA		28,882	P45523
Antigen 43		flu	flu						106,825	P39180
Inhibitor of vertebrate lysozyme		ivy	ivy			ivy	ivy		16,872	P0AD59
Maltoporin	lamB							lamB	49,912	P02943
Penicillin-binding protein activator LpoA		lpoA							72,825	P45464
Major outer membrane lipoprotein Lpp		lpp	lpp	lpp	lpp	lpp	lpp	lpp	8,323	P69776
Lipopolysaccharide export system protein LptA						lptA			20,127	P0ADV1
LPS-assembly protein LptD	lptD							lptD	89,671	P31554
Murein DD-endopeptidase MepS/Murein LD-carboxypeptidase								mepS	21,04	P0AFV4
D-methionine-binding lipoprotein MetQ		metQ		metQ					29,432	P28635
Periplasmic nitrate reductase			napA	napA	napA		napA		93,042	P33937
Murein hydrolase activator NlpD						nlpD			40,149	P0ADA3
Putative outer membrane porin protein NmpC	nmpC								40,302	P77747
Cytochrome c-552						nrfA			53,703	P0ABK9
Outer membrane protein A	ompA	ompA	ompA	ompA		ompA	ompA	ompA	37,201	P0A910
Outer membrane protein C	ompC	ompC	ompC	ompC		ompC		ompC	40,368	P06996
Outer membrane protein F	ompF								39,333	P02931
Outer membrane protein X	ompX	ompX				ompX			18,603	P0A917
Glucans biosynthesis protein G	opgG	opgG	opgG	opgG	opgG	opgG			57,912	P33136
Periplasmic oligopeptide-binding protein	oppA			oppA					60,899	P23843
Osmotically-inducibile lipoprotein E		osmE					osmE		12,021	P0ADB1
Osmotically-inducibile protein Y			osmY	osmY		osmY	osmY		21,074	P0AFH8
Peptidoglycan-associated lipoprotein		pal							18,824	P0A912
Inhibitor of g-type lysozyme							pliG		14,906	P76002
Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein				potD					38,867	P0AFK9
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	ppiD	ppiD	ppiD	ppiD					68,15	P0ADY1
Tail-specific protease	prc				prc				76,663	P23865
Glycine betaine/proline betaine-binding periplasmic protein				proX			proX		36,023	P0AFM2
Chaperone protein Skp (Seventeen kilodalton protein)		skp	skp	skp	skp	skp	skp	skp	17,688	P0AEU7
Soluble lytic murein transglycosylase	sit								73,353	P0AGC3
Outer membrane lipoprotein SlyB		slyB							15,602	P0A90
Periplasmic chaperone Spy (Spheroplast protein Y)		spy	spy	spy	spy	spy	spy		18,199	P77754
Chaperone SurA		surA			surA				47,284	P0ABZ6
Protein TolB			tolB			tolB	tolB		45,956	P0A855
Outer membrane protein TolC	tolC	tolC							53,741	P02930
Periplasmic trehalase	treA								63,637	P13482
Putative acyl-CoA thioester hydrolase YbhC				ybhC					46,082	P46130
Probable L,D-transpeptidase YbiS			ybiS			ybiS			33,325	P0AAX8
Uncharacterized lipoprotein YbjP				ybjP					18,991	P75818
Uncharacterized protein YdbJ								ydbJ	8,696	P0ACW2
Uncharacterized protease YdcP			ydcP		ydcP				72,702	P76104
Protein YdgA	ydgA	ydgA		ydgA					54,689	P77804
Protein YdgH				ydgH		ydgH			33,903	P76177
Uncharacterized lipoprotein YfhM	yfhM	yfhM							181,585	P76578
Uncharacterized protein YhhA			yhhA	yhhA			yhhA		16,624	P0ADX7
Probable lipoprotein YiaD							yiaD		22,197	P37665
Probable L,D-transpeptidase YnhG			ynhG						36,082	P76193
Zinc resistance-associated protein			zraP				zraP		15,199	P0AAA9

Durch die etwa 60%ige Homologie und ähnliche Substratspezifität von DegQ und DegP ist besonders interessant, ob diese beiden Serinproteasen die gleichen Substrate aufweisen. DegQSA weist mit 30 Substraten zwar deutlich weniger Substrate auf als DegPSA, allerdings konnten tatsächlich unter den zwanzig häufigsten Treffern acht gemeinsame Substrate gefunden werden. Dabei ist besonders auffällig, dass darunter vier Außenmembranproteine, OmpA, OmpC, OmpX und TolC, sowie das Protein BamA, welches ein Hauptbestandteil des BAM-Komplexes und für die Insertion von OMP in die Außenmembran zuständig ist, gefunden wurden. Weiterhin wurden die gemeinsamen Substrate OpgG, welches in die Glucanbiosynthese involviert ist, sowie YdgA und YfhM gefunden. Desweiteren scheinen den Ergebnissen zufolge beide Proteasen Interaktionen mit der Serinprotease DegS, der Oxidoreduktase DsbA, der Prolinisoimerase PpiD und der Serinprotease Prc zu haben.

Ein weiterer interessanter Hinweis zum Zusammenspiel der unterschiedlichen Faltungshelfer im periplasmatischen Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle sind die Substrate mit Disulfidbrücke, die bei DsbA gefunden wurden. Von den vier Substraten mit Disulfidbrücke, die unter den 20 häufigsten Substraten bei DsbA gefunden wurden, sind drei auch Substrate anderer Faltungshelfer. OmpA wurde bei fast allen Faltungshelfern als Substrat gefunden, OmpA zusätzlich bei der Serinprotease DegPSA und ProX bei der Metalloprotease BepAEQ. Dies legt die Vermutung nahe, dass möglicherweise die Disulfidbrücke durch DsbA verknüpft wird, das Substrat aber zusätzlich von einem anderen Faltungshelfer bei der Faltung unterstützt wird.

Während in einer vorangegangenen Dissertation der Siderophor-Transporter FhuA, das Maltoporin LamB und ein monomeres Außenmembranprotein OmpW mittels Western-Blot-Analysen als Substrate der Faltungshelfer untersucht wurden (Weski, 2010), wurden diese OMP im Rahmen dieser Arbeit kaum detektiert. Dass die OMP FhuA, LamB und OmpW Substrate von DegP sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Ansonsten wurden LamB und FhuA nur noch als Substrate der Metalloprotease PtrAEQ gefunden. Die viel wichtigeren Substrate der Faltungshelfer scheinen die OMP OmpA und OmpC zu sein. Das OMP OmpA wurde zum Beispiel mit Ausnahme von PpiD bei allen anderen sieben Faltungshelfern als Substrat gefunden. Das OMP OmpC wurde noch bei sechs verschiedenen Faltungshelfern als Substrat gefunden. Die bereits publizierten Ergebnisse, dass SurA an der Faltung

von OmpA und OmpC beteiligt ist (Lazar und Kolter, 1996; Rouvière und Gross, 1996) werden durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Ricci *et al.* vermuten eine Interaktion von SurA mit BamA, einem Protein des BAM-Komplexes (Ricci *et al.*, 2013). Diese Interaktion könnte durch die hier erhaltenen Daten gestützt werden, da BamA unter den Substraten der Proliniso­merase SurA gefunden wurde. BamA wurde wie oben bereits erwähnt zusätzlich bei DegPSA, DegQSA aber auch DsbA gefunden. Es wäre also möglich, dass DsbA die Disulfidbrücke des OMP OmpA einfügt und das Protein dann an BamA zur Insertion in die Außenmembran weitergibt.

Weitere Substrate, die bei verschiedenen Faltungshelfern als Substrate gefunden wurden sind OpgG, AcrA, Lpp und FdoG. Bei OpgG handelt es sich um ein Protein, das in die osmoregulierte periplasmatische Glucanbiosynthese involviert ist. Dieses Substrat wurde bei den sechs Faltungsfaktoren DegPSA, DegQSA, SurA, DsbA/DsbAPT, PpiD und PrcSA gefunden. Die Effluxpumpe AcrA ist ein weiteres Substrat, welches bei fünf Faltungshelfern (DegQSA, SurA, DsbA/DsbAPT, BepAEQ und PtrAEQ) unter den häufigsten Substraten gefunden wurde. Unter den nach MS/MS-Count seltener gefundenen Substraten findet man allerdings AcrA auch bei DegPSA zusätzlich als Substrat (siehe Anhang). Damit wäre dies auch ein zusätzliches Substrat zu den oben beschriebenen gemeinsamen Substraten von DegPSA und DegQSA. Das Protein FdoG wurde ebenfalls bei fünf Faltungshelfern unter den häufigsten Substraten gefunden. Das Außenmembranlipoprotein Lpp wurde mit Ausnahme von DegPSA bei allen untersuchten Faltungshelfern unter den 20 häufigsten Substraten gefunden. Bei den seltenen Substraten ist es jedoch auch bei DegPSA zu finden (siehe Anhang).

Neben diesen Substraten wurden andere Faltungshelfer als mögliche Bindungspartner gefunden. Bei sechs Faltungsfaktoren wurden bei der massenspektrometrischen Analyse die weiteren Faltungshelfer DsbA und Spy gefunden, bei fünf Faltungshelfern die Serinprotease DegS und bei noch vier Faltungshelfern die Serinprotease DegP sowie die Proliniso­merasen FkpA und PpiD.

Bei YdcP, einem potentiellen Substrat von SurA sowie PpiD konnte sowohl PpiD als Substrat bei SurA als auch SurA als Substrat von PpiD gefunden werden. Solche Überschneidungen fielen zum Beispiel auch bei dem Substrat OppA auf. OppA ist Substrat von DegPSA, als auch DsbA. Bei DsbA aus JB60 (*surA dsbA*) kam neben OppA auch DegP vor und bei DegPSA aus JB26 (*degP ppiD*) kam neben OppA auch



DsbA vor. Vor allem bei den häufigen Substraten wie OmpA oder OmpC kommen solche Überschneidungen vor.

Am Häufigsten trat das Chaperon Skp unter den Ergebnissen der potentiellen Substrate auf. Skp wurde bei sieben der acht untersuchten Faltungsfaktoren als Bindungspartner oder Substrat unter den häufigsten Ergebnissen gefunden. Auch bei DegPSA kann Skp unter den selten gefundenen Substraten gefunden werden (siehe Anhang). Dies legt die Vermutung nahe, dass Skp möglicherweise eher als zusätzlicher Bindungspartner und nicht als Substrat angesehen werden kann. Das Skp und OmpA bei fast allen Faltungsfaktoren gefunden wurden, könnte möglicherweise die These von Bulieris *et al.* unterstützen, dass Skp bei der Faltung und Insertion von OmpA assistiert (Bulieris *et al.*, 2003).

Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass ein Substrat mit mehreren Faltungsfaktoren bzw. Enzymen interagieren kann und wahrscheinlich zeitgleich von mehreren Faltungsfaktoren an einem Substrat gearbeitet wird.

#### **4.4 Verständnis von möglichen Interaktionen der Faltungshelfer in der Stressantwort**

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Faltung eines Substrats nicht linear abläuft, also durch die Bindung eines Faltungsfaktors nach dem anderen, sondern diese gleichzeitig arbeiten. Diese Hypothese wird durch die ersten oben diskutierten Massedaten gestützt und sollte durch Degradationsassays verifiziert werden. Dazu wurden Proteasen ausgewählt, da bei der Proteolyse von Substraten Schnittstellen kartiert werden können und damit die Aktivität dargestellt werden kann. Neben den Serinproteasen DegP, DegQ sowie Prc und dem denaturierten Substrat EfeB wurden die drei Faltungshelfer DsbAPT, PpiD und SurA für den Einsatz in den Degradationsassays ausgewählt. Es wurde jeweils eine Protease mit einem Faltungshelfer und dem Substrat in einem Degradationsassay eingesetzt, um zu untersuchen, ob bestimmte Schnittstellen entfallen, die bei der Degradation des Substrats ohne Zugabe eines Faltungshelfers durch die jeweilige Protease auftraten. Es wurden bei der Zugabe der Faltungshelfer Unterschiede im Schnittmuster und der Anzahl der Schnitte festgestellt, was auf eine Protektion des denaturierten Substrats durch die Faltungsfaktoren hindeutet und damit auf eine gleichzeitige Bindung von zwei Faltungsfaktoren. Vor allem bei den

Degradationsassays mit den Proteasen DegQ und Prc konnte eine deutliche Protektion bestimmter Sequenzbereiche von EfeB detektiert werden. Das denaturierte Substrat wurde protektiert, indem die Anzahl an Schnitten in einem bestimmten Bereich reduziert wurde, oder wenn es zu einer zeitlichen Verzögerung der Schnittanzahl kam. In einigen Bereichen kam es sogar zur kompletten Protektion, indem in diesem Bereich überhaupt keine Schnitte mehr auftraten (Abbildung 3.39).

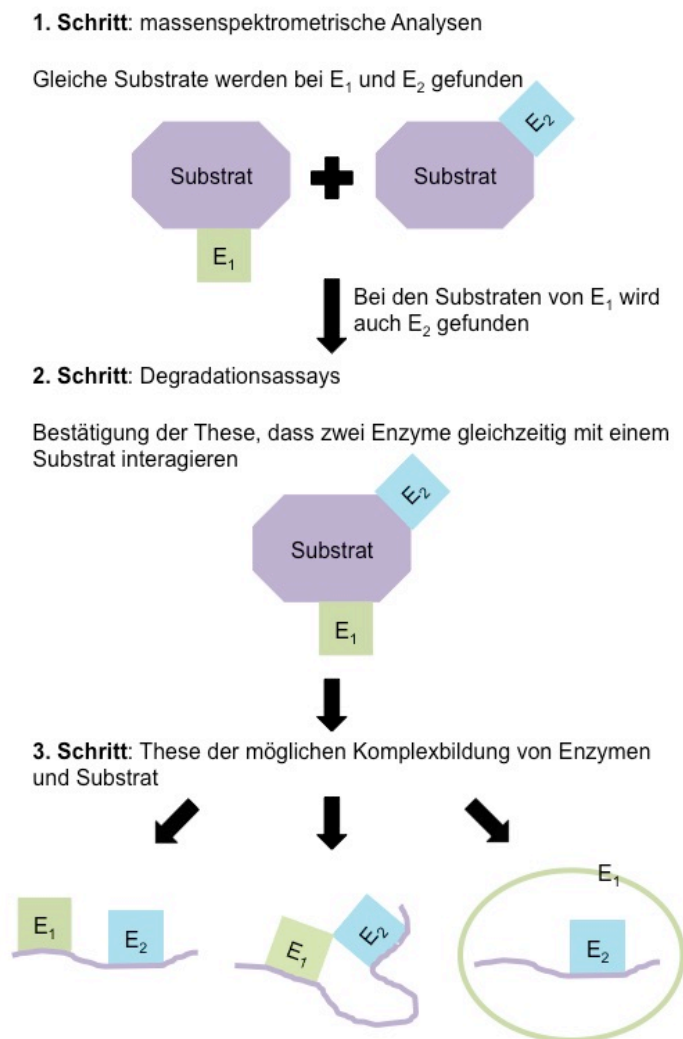
Bei dem Degradationsassay mit der Serinprotease DegP fällt die Protektion des Substrats EfeB sehr gering aus. Hier ist nur eine marginale Protektion bei allen drei Faltungshelfern zu erkennen. Möglicherweise liegt dies daran, dass DegP unter den getesteten Bedingungen kaum Bindungen mit anderen Faltungshelfern zulässt. Es ist bekannt, dass die Serinprotease essentiell für die Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit von *E. coli* ist und die Wichtigkeit wurde durch die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen dieser Arbeit in Form der vielen gebundenen Substrate unterstrichen. DegP ist ein multifunktionales Protein mit Chaperon- und Proteasefunktion, welches primär selber selektioniert, ob ein Substrat gefaltet werden kann oder abgebaut wird. Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Versuchsbedingungen haben anscheinend nur den äußerst effizienten Abbau des EfeB zugelassen. Die ersten leichten Protektionen die gemessen werden konnten, lassen aber die Vermutung zu, dass durch Änderungen der Versuchsbedingungen möglicherweise auch bei DegP eine deutliche Protektion des Substrats durch Faltungsfaktoren erfolgreich gezeigt werden könnte. Für das 60%ig homologe DegQ konnte nämlich eine deutliche Protektion gemessen werden.

Hier fällt die Protektion des Substrats EfeB bei dem Verdau durch DegQ deutlich stärker aus. Alle drei getesteten Faltungshelfer DsbAPT, PpiD und SurA schützen vor der Proteolyse von EfeB. Die drei Faltungshelfer weisen hier ähnliche Protektionsmuster auf. Mittig und am Ende von EfeB protektieren alle drei Faltungshelfer in hohem Maße. DsbAPT und PpiD schützen zusätzlich am Anfang der Sequenz im Bereich von 50 bis 99 Aminosäuren. Interessant ist dabei, dass DsbAPT in zwei Bereichen protektiert, in denen jeweils ein Cystein vorkommt. Dies zeigt eine mögliche *in vivo*-Funktion von DsbA auf. Bei korrekter Faltung von Proteinen spielen im Periplasma die Disulfidbrückenbindungen eine wichtige Rolle. Eine parallele Faltung und Disulfidbrückenbildung wäre dabei positiv.

Bei der Protease Prc wird das Substrat EfeB nur durch den Faltungshelfer SurA protektiert. Dabei wurde vor allem die vordere Hälfte des Substrats vor Schnitten geschützt. In dem Bereich zwischen 50 und 99 Aminosäuren kam es zu einer

kompletten Protektion. Dies zeigt, dass es sich nicht um willkürliche Effekte handelt, sondern wahrscheinlich spezifische Effekte den Protektionen zugrunde liegen.

Diese Ergebnisse, dass ein Faltungshelfer das denaturierte Substrat protektiert während ein zweites Enzym zeitgleich zugängliche Bereiche degradiert, bestätigen die in dieser Arbeit aufgestellte These, dass mehrere Enzyme bzw. Faltungsfaktoren gleichzeitig an einem Substrat binden.



**Abbildung 4.1: Herleitung und Möglichkeiten der Komplexbildung von Enzymen und Substrat**

Im ersten Schritt wurden durch die massenspektrometrischen Analysen bei verschiedenen Faltungshelfern bzw. Enzymen teilweise die gleichen Substrate gefunden. Da unter den Substraten der untersuchten Faltungshelfer auch weitere Faltungshelfer gefunden wurden, wurde die Theorie aufgestellt, dass mehrere Enzyme gleichzeitig an einem Substrat gebunden sein können (Schritt 2). Dies wurde durch Degradationsassays bestätigt. Dadurch wurde im dritten Schritt die These aufgestellt, dass die Enzyme möglicherweise Komplexe mit dem Substrat eingehen. Dafür gibt es verschiedene Szenarien. Die erste Möglichkeit wäre, dass die Enzyme unabhängig voneinander nebeneinander auf dem denaturierten Substrat gebunden haben könnten. Außerdem könnten die Enzyme zusammen einen Komplex bilden. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten: Die Enzyme könnten miteinander in Interaktion getreten sein und dabei das Substrat binden, oder im speziellen Fall von DegP und DegQ gibt es zusätzlich die Möglichkeit, dass das Substrat mitsamt eines gebundenen Enzyms in den Käfig der oligomeren Serinproteasen aufgenommen wird.

Die Möglichkeiten der Komplexbildung von Faltungsfaktoren/Enzymen und Substraten stellen dabei eine interessante Fragestellung dar (Abbildung 4.1). Die erste Möglichkeit wäre, dass die beiden Faltungshelfer bzw. Enzyme unabhängig voneinander an zwei verschiedenen Stellen an das denaturierte Substrat binden. Daneben gibt es die Möglichkeit, dass die beiden Faltungshelfer bzw. Enzyme zusammen einen Komplex ausbilden. Dabei könnte man zwei Varianten vermuten: Zum einen könnten die Enzyme in Interaktion treten und dann gemeinsam das Substrat binden. Der dabei entstandene Enzymkomplex könnte dann die Stressantwort erheblich effizienter gestalten. Da der Enzym-Substrat-Komplex häufig der reaktionslimitierende Schritt ist, könnte die Bildung eines Enzymkomplexes diese Schritte in der Summe deutlich beschleunigen und damit auch die gesamte Stressantwort.

Betrachtet man die beiden Enzyme DegP und DegQ, ergibt sich hierbei möglicherweise ein besonders interessanter Fall von Interaktion. DegP bzw. DegQ sind beide in der Lage bei Aktivierung einen hocholigomeren Zustand einzunehmen (Meltzer *et al.*, 2008; Sawa *et al.*, 2011). Die Kristallstrukturen von Krojer *et al.* haben gezeigt, dass das aktive 24mer von DegP eine molekulare Masse von 1,13 MDa hat. Der innere Hohlraum weist einen Durchmesser von 110 Å auf. Dieser Raum ist groß genug um OMP wie OmpA, OmpF, OmpC und LamB im Inneren abzubauen oder das korrekt gefaltete Protein als Haltechaperon durch das Periplasma zur Außenmembran zu transportieren (Krojer *et al.*, 2008). Aufgrund der hier vorliegenden Daten, die zeigen, dass bei den Proteolysen von DegP, aber vor allem auch von DegQ, in den Degradationsassays mit Faltungshelfern protektierte Bereiche auftreten, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass auch hier eine Komplexbildung stattfindet. In diesem Komplex könnten nun das denaturierte Substrat mitsamt eines gebundenen Faltungshelfers/Enzyms in den zentralen Hohlraum der aktiven oligomeren Serinproteasen aufgenommen werden.

Dies wäre eine neuartige Komplexbildung, die eine extrem effiziente, weil lokallimitierte (Fehl-)Faltungskorrektur erlauben würde.

Zusammenfassend kann die in dieser Arbeit etablierte Methode der Degradationsassays mit anschließender massenspektroskopischer Analyse für eine großangelegte Charakterisierung des Netzwerks der Stressantwort genutzt werden. Kombinationen von zwei, aber auch mehr Faltungshelfern können so untersucht werden und in sehr kurzer Zeit im Hinblick auf ihre Interaktion analysiert werden. Damit würde sich das Verständnis der Faltungsfaktoren und deren möglicher Komplexbildung

erweitern lassen, um so potentielle Kandidaten bzw. Kombinationen von Faltungsfaktoren weiter zu studieren.

## 4.5 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen die Hinweise auf ein potentielles Netzwerk der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle von *E. coli*. Erstmals konnte dabei biochemisch die mögliche Interaktion von mehreren Faltungsfaktoren an einem Substrat dargestellt werden. Die hierfür etablierte Methode der Degradationsassays zeigt klar Hinweise, dass verschiedene Faltungsfaktoren an dem *in vivo*-Substrat EfeB binden, während die Proteasen DegP, DegQ und Prc an diesem Substrat aktiv sind. Hypothesen über die Interaktionsmöglichkeiten alleine und im Komplex konnten aufgestellt werden. Die weitere detailliertere Aufklärung und Verifikation der Organisation dieses Netzwerks sollte das Ziel zukünftiger Untersuchungen sein.

Die Untersuchung der Interaktion verschiedener Faltungsfaktoren mit einem Substrat stellt eine interessante Möglichkeit dar, weitere Einblicke in die Organisation des Netzwerks zu erhalten.

Für *in vivo*- und *in vitro*-Experimente wäre eine weitere Möglichkeit mögliche Substrate aus den massenspektrometrischen Analysen auszuwählen, die eine messbare enzymatische Aktivität aufweisen und diese zum Aufbau eines Assays zu nutzen. Zum Beispiel könnte in *Knockout*-Stämmen ein enzymatisch aktives Substrat unter Stressbedingungen exprimiert werden, so dass es fehlgefaltet vorliegt. Dann werden die Doppel-*Knockouts* einzeln und in Kombination kompensiert und geprüft, ob das Substrat effizienter zurückgefaltet wird. Wenn zwei Faltungsfaktoren bessere Ergebnisse zeigen als jeweils einer alleine, dann bestätigt dies die Vermutung, dass beide Enzyme an dem Substrat aktiv sind.

Um die Komplexbildung von Substraten mit mehreren Faltungshelfern zu untersuchen, könnte zum Beispiel mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) mehr über die Kinetik der Bindungen erfahren. Durch verschiedene Kombinationen, in welcher Reihenfolge die einzelnen potentiellen Komplexbildner für Messungen in der ITC eingesetzt werden, könnte die Ermittlung der verschiedenen Bindungskonstanten weitere Einblicke zur Klärung der Bindungen von Substrat und Faltungshelfern bzw. Enzymen liefern. Abgeleitet aus den kinetischen Daten könnten dann die bisherigen

Theorien der unabhängigen Bindung oder Bildung von Komplexen (Abbildung 4.1) bestätigt werden.

Aus den Ergebnissen der Degradationsassays und den ITC-Daten könnten die interessanten Kandidaten ausgewählt werden, um diese dann in der nativen Massenspektrometrie zu untersuchen. Diese Methode könnte zur Untersuchung von Proteinkomplexen, in diesem Fall der Komplexe aus Substrat und Faltungshelfern, hinsichtlich Architektur, Assemblierungsweg und Funktionalität herangezogen werden. Es besteht die Möglichkeit Informationen über nicht-kovalente Bindungen zu gewinnen, indem über die Auswertung der erhaltenen Spektren die Anzahl der Bindungspartner und deren Affinität bestimmt werden kann.

Im finalen Schritt wären dann Strukturanalysen durch Kristallisation denkbar. Dazu würde z. B. die proteolytisch inaktive DegPSA-Mutante genutzt, um die Theorie zu untersuchen, ob im Hohlraum des oligomeren Zustands ein Komplex aus Substrat und weiterem Faltungshelfer zu finden ist.

## 5 Zusammenfassung

Die Vielzahl an Proteinen jeder Zelle stellt diese vor die Herausforderung, dass die Proteine im richtigen Kompartiment vorliegen und aktiv sind. Aus diesem Grund haben bakterielle Zellen effektive Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle entwickelt, indem sie durch die Kontrolle des Proteinfaltungszustands die richtige Faltung, Reparatur oder Degradation der Proteine unterstützen. Reguliert wird dies durch spezielle Signalsysteme, welche die Genexpression verschiedener Chaperone, Faltungskatalysatoren und Proteasen an den momentanen Bedarf anpassen. Vor allem das Periplasma ist aufgrund der Zellarchitektur den Schwankungen der Umweltbedingungen in hohem Maße ausgesetzt, wodurch der Faltungszustand und die Funktionalität von periplasmatischen Proteinen, sowie die Integrität der Zellhülle beeinflusst wird.

Auch in humanen Zellen können fehl- oder ungefaltene Proteine zu schwerwiegenden Folgen für den gesamten Organismus führen. So wird zum Beispiel die Aggregation von Proteinen mit Krankheiten wie Alzheimer und Mukoviszidose in Verbindung gebracht. Um ein Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Proteinfaltung zu erlangen, repräsentiert die Zellhülle des gramnegativen Bakteriums *E. coli* ein experimentelles Modellsystem. Die Faktoren der Proteinqualitätskontrolle scheinen in einem flexiblen Netzwerk organisiert zu sein, welches die Effizienz und Reaktionsfähigkeit erhöht und die Stabilität des Systems gewährleistet.

Weski und Ehrmann sammelten erste Hinweise auf ein potentielles Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli*. Die sieben Doppel-KO-Mutanten (*degP dsbA*, *degP tsp*, *degP yfgC*, *degP ppiD*, *surA dsbA*, *surA ptrA* und *surA yfgC*) zeigten in der Dissertation von Dr. Juliane Weski unter Stressbedingungen Probleme mit den Außenmembranproteinen FhuA, OmpW und LamB auf Proteinebene. In diesen Stämmen wurde entweder eine Reduktion der FhuA- oder OmpW-Menge in der Außenmembran detektiert, ohne dass eine reduzierte Genexpression vorlag, oder die Stämme wiesen Unregelmäßigkeiten im LamB-Vorkommen auf (Weski, 2010; Weski und Ehrmann, 2012).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die zuvor gesammelten ersten Hinweise auf ein potentielles Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle von *E. coli* weitergehend untersucht werden.

Da über potentielle Interaktionen der Faltungshelfer untereinander und zu den entsprechenden Substraten bisher wenig bekannt ist, wurde zunächst in den oben genannten Deletionsstämmen jeweils ein *Knockout* durch eine extrachromosomale Überexpression ausgeglichen. Die dabei hergestellten Proteine wurden im Anschluss gereinigt und in Bezug auf die gebundenen Substrate massenspektrometrisch analysiert. Um eine Proteolyse der Substrate zu verhindern, wurden bei den Proteasen enzymatisch inaktive Mutanten genutzt.

Es konnten für jeden in dieser Arbeit untersuchten Faltungshelfer mittels massenspektrometrischer Analysen gebundene potentielle Substrate detektiert werden. Die Anzahl der Substrate variierte dabei stark. Durch die Anzahl an Substraten scheinen die Proteine DegP, DegQ, DsbA/DsbAPT, SurA und Prc Schlüsselspieler in dem System der Proteinqualitätskontrolle zu sein, während BepA, PtrA und PpiD Enzyme mit enger Substratspezifität zu sein scheinen.

Besonders interessant sind die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, dass Faltungshelfer durchaus gemeinsame Substrate haben. So wurden zum Beispiel bei zwei oder sogar mehreren Faltungshelfern die gleichen Substrate gefunden. Diese Schnittmengen bestätigen die Hypothese, dass die periplasmatische Proteinqualitätskontrolle als flexibles Netzwerk organisiert ist. Ein weiterer Punkt, der diese These stützt, ist die Tatsache, dass neben potentiellen Substraten auch andere Faltungshelfer an die jeweils untersuchten Faltungshelfer gebunden haben.

Um die Hypothese zu untersuchen, dass mehrere Faltungsfaktoren gleichzeitig mit einem Substrat interagieren, wurden Degradationsassays mit den Proteasen DegP, DegQ und Prc und dem denaturierten Substrat EfeB etabliert und durchgeführt. Durch die Zugabe der Faltungshelfer DsbAPT, PpiD und SurA wurden Unterschiede im Schnittmuster und der Anzahl der Schnitte festgestellt, was auf eine Protektion des denaturierten Substrats durch die Faltungshelfer hindeutet. Diese Ergebnisse, dass ein Faltungshelfer das denaturierte Substrat protektiert, während ein zweites Enzym zeitgleich zugängliche Bereiche degradiert, bestätigen die in dieser Arbeit aufgestellte These, dass mehrere Enzyme bzw. Faltungshelfer gleichzeitig an einem Substrat binden.

Die Möglichkeiten der Komplexbildung von Faltungshelfern/Enzymen und Substraten stellen dabei eine interessante Fragestellung für weiterführende Studien dar.



## 5.1 Summary

The large number of proteins in each cell poses the challenge of ensuring that the proteins are present and active in the right compartment. For this reason, bacterial cells have developed effective mechanisms of protein quality control by supporting the proper folding, repair or degradation of proteins by controlling the state of protein folding. This is regulated by special signalling systems that adapt the gene expression of various chaperones, folding catalysts and proteases to the momentary need. The periplasm in particular is highly exposed to environmental variations due to the cell architecture, which influences the folding state and functionality of periplasmatic proteins, as well as the integrity of the cell envelope.

Even in human cells, misfolded or unfolded proteins can lead to severe consequences for the entire organism. For example, the aggregation of proteins is associated with diseases such as Alzheimer's and cystic fibrosis. In order to gain an understanding of the basic mechanisms of protein folding, the cell envelope of the gram-negative bacterium *E. coli* represents an experimental model system. The factors of protein quality control appear to be organized in a flexible network that increases efficiency and responsiveness and ensures the stability of the system.

Weski and Ehrmann collected first evidence of a potential network of protein quality control in the cell envelope of *E. coli*. The seven double-KO mutants (*degP dsbA*, *degP tsp*, *degP yfgC*, *degP ppiD*, *surA dsbA*, *surA ptrA* and *surA yfgC*) showed problems with the outer membrane proteins FhuA, OmpW and LamB at the protein level under stress conditions in Dr. Juliane Weski's dissertation. In these strains, either a reduction of the FhuA or OmpW amount in the outer membrane was detected without a reduced gene expression, or the strains showed irregularities in the LamB occurrence (Weski 2010, Weski and Ehrmann 2012).

Within the scope of the present work, the previously collected first indications of a potential network of protein quality control in the cell envelope of *E. coli* were to be investigated in further detail.

Since little is known about potential interactions of the folding factors with each other and with the corresponding substrates, a knockout in each of the above-mentioned deletion strains was initially compensated by extrachromosomal overexpression. The proteins produced in the process were then purified and analysed by mass

spectrometry with respect to the bound substrates. In order to prevent proteolysis of the substrates, enzymatically inactive mutants of the proteases were used.

For each folding factor investigated in this work, potential bound substrates could be detected using mass spectrometric analyses. The number of substrates varied greatly. Due to the number of substrates, the proteins DegP, DegQ, DsbA/DsbAPT, SurA and Prc seem to play key roles in the system of protein quality control, while BepA, PtrA and PpiD appear to be enzymes with narrow substrate specificity.

Of particular interest are the results obtained from this work, which show that folding factors have common substrates. For example, the same substrates were found in the analysis of interaction partners of two or more folding factors. These intersections confirm the hypothesis that periplasmic protein quality control is organised as a flexible network. Another point that supports this hypothesis is the fact that, in addition to potential substrates, other folding factors have also linked to the respective folding factors investigated.

In order to investigate the hypothesis that several folding factors interact simultaneously with a substrate, degradation assays with the proteases DegP, DegQ and Prc and the denatured substrate EfeB were established and performed. The addition of the folding factors DsbAPT, PpiD and SurA revealed differences in the pattern and number of cuts, suggesting protection of the denatured substrate by the folding factors. These results, that a folding factor protects the denatured substrate while a second enzyme degrades simultaneously accessible areas, confirm the hypothesis that several enzymes or folding factors bind simultaneously to one substrate.

The possibilities of complex formation of folding factors/enzymes and substrates represent an interesting question for further studies.

## 6 Literaturverzeichnis

Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their components. Recommended rules for 1970. (1970): *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 351 (9): S. 1055-1063.

Ades, S. E., L. E. Connolly, B. M. Alba und C. A. Gross (1999): The Escherichia coli sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev* 13 (18): S. 2449-2461.

Alba, B. M., J. A. Leeds, C. Onufryk, C. Z. Lu und C. A. Gross (2002): DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev* 16 (16): S. 2156-2168.

Alba, B. M., H. J. Zhong, J. C. Pelayo und C. A. Gross (2001): degS (hhoB) is an essential Escherichia coli gene whose indispensable function is to provide sigma (E) activity. *Mol Microbiol* 40 (6): S. 1323-1333.

Amaral, M. D. (2004): CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci* 23 (1-2): S. 41-48.

Antonoaea, R., M. Fürst, K. Nishiyama und M. Müller (2008): The periplasmic chaperone PpiD interacts with secretory proteins exiting from the SecYEG translocon. *Biochemistry* 47 (20): S. 5649-5656.

Antranikian, G. (2006). *Angewandte Mikrobiologie*. Berlin Heidelberg, Deutschland, Springer-Verlag.

Arié, J. P., N. Sassoon und J. M. Betton (2001): Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of Escherichia coli. *Mol Microbiol* 39 (1): S. 199-210.

Bader, M., W. Muse, D. P. Ballou, C. Gassner und J. C. Bardwell (1999): Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell* 98 (2): S. 217-227.

Baneyx, F. und G. Georgiou (1991): Construction and characterization of Escherichia coli strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates in vivo. *J Bacteriol* 173 (8): S. 2696-2703.

Barbas, J. A., D. Vázquez und A. Rodríguez-Tébar (1985): Final steps of the maturation of Omp F, a major protein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 188 (1): S. 73-76.

Bardwell, J. C., J. O. Lee, G. Jander, N. Martin, D. Belin und J. Beckwith (1993): A pathway for disulfide bond formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (3): S. 1038-1042.

Barrett, A. J., N. D. Rawlings und E. A. O'Brien (2001): The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol* 134 (2-3): S. 95-102.

- Baslé, A., G. Rummel, P. Storici, J. P. Rosenbusch und T. Schirmer (2006): Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J Mol Biol* 362 (5): S. 933-942.
- Bass, S., Q. Gu und A. Christen (1996): Multicopy suppressors of prc mutant *Escherichia coli* include two HtrA (DegP) protease homologs (HhoAB), DksA, and a truncated R1pA. *J Bacteriol* 178 (4): S. 1154-1161.
- Becker, A. B. und R. A. Roth (1993): Identification of glutamate-169 as the third zinc-binding residue in proteinase III, a member of the family of insulin-degrading enzymes. *Biochem J* 292 ( Pt 1): S. 137-142.
- Beebe, K. D., J. Shin, J. Peng, C. Chaudhury, J. Khera und D. Pei (2000): Substrate recognition through a PDZ domain in tail-specific protease. *Biochemistry* 39 (11): S. 3149-3155.
- Behrens, S., R. Maier, H. de Cock, F. X. Schmid und C. A. Gross (2001): The SurA periplasmic PPLase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *Embo j* 20 (1-2): S. 285-294.
- Berkmen, M., D. Boyd und J. Beckwith (2005): The nonconsecutive disulfide bond of *Escherichia coli* phytase (AppA) renders it dependent on the protein-disulfide isomerase, DsbC. *J Biol Chem* 280 (12): S. 11387-11394.
- Bessette, P. H., J. J. Cotto, H. F. Gilbert und G. Georgiou (1999): In vivo and in vitro function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J Biol Chem* 274 (12): S. 7784-7792.
- Betton, J. M., N. Sassoon, M. Hofnung und M. Laurent (1998): Degradation versus aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 273 (15): S. 8897-8902.
- Bitto, E. und D. B. McKay (2002): Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins. *Structure* 10 (11): S. 1489-1498.
- Bitto, E. und D. B. McKay (2003): The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. *J Biol Chem* 278 (49): S. 49316-49322.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau und Y. Shao (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277 (5331): S. 1453-1462.
- Blum, H., H. Beier und H. J. Gross (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in Polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8: S. 93-99.
- Boyd, D., C. Manoil und J. Beckwith (1987): Determinants of membrane protein topology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (23): S. 8525-8529.

- Boyd, D., C. Schierle und J. Beckwith (1998): How many membrane proteins are there? *Protein Sci* 7 (1): S. 201-205.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: S. 248-254.
- Braselmann, E., J. L. Chaney, M. M. Champion und P. L. Clark (2016): DegP Chaperone Suppresses Toxic Inner Membrane Translocation Intermediates. *PLoS One* 11 (9): S. e0162922.
- Brass, J. M., C. F. Higgins, M. Foley, P. A. Rugman, J. Birmingham und P. B. Garland (1986): Lateral diffusion of proteins in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 165 (3): S. 787-795.
- Bravo-Rodriguez, K., B. Hagemeyer, L. Drescher, M. Lorenz, J. Rey, M. Meltzer, F. Kaschani, M. Kaiser und M. Ehrmann (2018): Utilities for Mass Spectrometry Analysis of Proteins (UMSAP): Fast post-processing of mass spectrometry data. *Rapid Commun Mass Spectrom* 32 (19): S. 1659-1667.
- Bulieris, P. V., S. Behrens, O. Holst und J. H. Kleinschmidt (2003): Folding and insertion of the outer membrane protein OmpA is assisted by the chaperone Skp and by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 278 (11): S. 9092-9099.
- Bury-Moné, S., Y. Nomane, N. Reymond, R. Barbet, E. Jacquet, S. Imbeaud, A. Jacq und P. Boulloc (2009): Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 5 (9): S. e1000651.
- Casadaban, M. J. (1976): Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* 104 (3): S. 541-555.
- Chaba, R., I. L. Grigorova, J. M. Flynn, T. A. Baker und C. A. Gross (2007): Design principles of the proteolytic cascade governing the sigmaE-mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered, and rapid signal transduction. *Genes Dev* 21 (1): S. 124-136.
- Chen, R. und U. Henning (1996): A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins. *Mol Microbiol* 19 (6): S. 1287-1294.
- Chung, C. T., S. L. Niemela und R. H. Miller (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (7): S. 2172-2175.
- Clausen, T., M. Kaiser, R. Huber und M. Ehrmann (2011): HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12 (3): S. 152-162.
- Clausen, T., C. Southan und M. Ehrmann (2002): The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell* 10 (3): S. 443-455.

Collinet, B., H. Yuzawa, T. Chen, C. Herrera und D. Missiakas (2000): RseB binding to the periplasmic domain of RseA modulates the RseA:σ<sup>E</sup> interaction in the cytoplasm and the availability of σ<sup>E</sup>.RNA polymerase. *J Biol Chem* 275 (43): S. 33898-33904.

Daimon, Y., C. Iwama-Masui, Y. Tanaka, T. Shiota, T. Suzuki, R. Miyazaki, H. Sakurada, T. Lithgow, N. Dohmae, H. Mori, T. Tsukazaki, S. I. Narita und Y. Akiyama (2017): The TPR domain of BepA is required for productive interaction with substrate proteins and the beta-barrel assembly machinery complex. *Mol Microbiol* 106 (5): S. 760-776.

Danese, P. N., G. R. Oliver, K. Barr, G. D. Bowman, P. D. Rick und T. J. Silhavy (1998): Accumulation of the enterobacterial common antigen lipid II biosynthetic intermediate stimulates *degP* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180 (22): S. 5875-5884.

Danese, P. N. und T. J. Silhavy (1997): The σ<sup>E</sup> and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 11 (9): S. 1183-1193.

Danese, P. N. und T. J. Silhavy (1998): CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol* 180 (4): S. 831-839.

Dartigalongue, C. und S. Raina (1998): A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Embo j* 17 (14): S. 3968-3980.

de Keyzer, J., C. van der Does und A. J. Driessen (2003): The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell Mol Life Sci* 60 (10): S. 2034-2052.

Depuydt, M., J. Messens und J. F. Collet (2011): How proteins form disulfide bonds. *Antioxid Redox Signal* 15 (1): S. 49-66.

Dobson, C. M. (2003): Protein folding and misfolding. *Nature* 426 (6968): S. 884-890.

Driessen, A. J. und N. Nouwen (2008): Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* 77: S. 643-667.

Ehrmann, M. (2005). Protein folding in the periplasm and outer membrane of *E. coli*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Fairbanks, G., T. L. Steck und D. F. Wallach (1971): Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10 (13): S. 2606-2617.

Fink, A. L. (1999): Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79 (2): S. 425-449.

Fuchs, G., T. Eitinger, J. Heider, B. Kemper, E. Kothe, J. Overmann, B. Schink, E. Schneider und G. Unden (2014). Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart, Deutschland, Georg Thieme Verlag KG.

- Ge, X., Z. X. Lyu, Y. Liu, R. Wang, X. S. Zhao, X. Fu und Z. Chang (2014a): Identification of FkpA as a key quality control factor for the biogenesis of outer membrane proteins under heat shock conditions. *J Bacteriol* 196 (3): S. 672-680.
- Ge, X., R. Wang, J. Ma, Y. Liu, A. N. Ezemaduka, P. R. Chen, X. Fu und Z. Chang (2014b): DegP primarily functions as a protease for the biogenesis of beta-barrel outer membrane proteins in the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Febs j* 281 (4): S. 1226-1240.
- Goff, S. A. und A. L. Goldberg (1985): Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* 41 (2): S. 587-595.
- González-Montalbán, N., M. M. Carrió, S. Cuatrecasas, A. Aris und A. Villaverde (2005): Bacterial inclusion bodies are cytotoxic in vivo in absence of functional chaperones DnaK or GroEL. *J Biotechnol* 118 (4): S. 406-412.
- Gordon, G., R. C. Gayda und A. Markovitz (1984): Sequence of the regulatory region of *omp T*, the gene specifying major outer membrane protein a (3b) of *Escherichia coli* K-12: implications for regulation and processing. *Mol Gen Genet* 193 (3): S. 414-421.
- Göthel, S. F. und M. A. Marahiel (1999): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 55 (3): S. 423-436.
- Gram, H. C. (1884): Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin* 2: S. 185-189.
- Grimshaw, J. P., C. U. Stirnimann, M. S. Brozzo, G. Malojcic, M. G. Grütter, G. Capitani und R. Glockshuber (2008): DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 380 (4): S. 667-680.
- Guddat, L. W., J. C. Bardwell und J. L. Martin (1998): Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization. *Structure* 6 (6): S. 757-767.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166 (4): S. 557-580.
- Hasenbein, S., M. Merdanovic und M. Ehrmann (2007): Determinants of regulated proteolysis in signal transduction. *Genes Dev* 21 (1): S. 6-10.
- Hedstrom, L. (2002): Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 102 (12): S. 4501-4524.
- Hennecke, G., J. Nolte, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener und S. Behrens (2005): The periplasmic chaperone SurA exploits two features characteristic of integral outer membrane proteins for selective substrate recognition. *J Biol Chem* 280 (25): S. 23540-23548.
- Hiniker, A. und J. C. Bardwell (2004): In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem* 279 (13): S. 12967-12973.

<http://www.stepdb.eu/index.php>. (04.12.2018; 13:22 Uhr).

Hunke, S. und J. M. Betton (2003): Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 50 (5): S. 1579-1589.

Inaba, K. (2009): Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*. *J Biochem* 146 (5): S. 591-597.

Isaac, D. D., J. S. Pinkner, S. J. Hultgren und T. J. Silhavy (2005): The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (49): S. 17775-17779.

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. A one-letter notation for amino acid sequences. Tentative rules. (1969): *Biochem J* 113 (1): S. 1-4.

Jarchow, S., C. Luck, A. Gorg und A. Skerra (2008): Identification of potential substrate proteins for the periplasmic *Escherichia coli* chaperone Skp. *Proteomics* 8 (23-24): S. 4987-4994.

Jones, C. H., P. N. Danese, J. S. Pinkner, T. J. Silhavy und S. J. Hultgren (1997): The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *Embo j* 16 (21): S. 6394-6406.

Kadokura, H. und J. Beckwith (2009): Detecting folding intermediates of a protein as it passes through the bacterial translocation channel. *Cell* 138 (6): S. 1164-1173.

Kadokura, H., F. Katzen und J. Beckwith (2003): Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* 72: S. 111-135.

Katzen, F. und J. Beckwith (2000): Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell* 103 (5): S. 769-779.

Keiler, K. C. und R. T. Sauer (1995): Identification of active site residues of the Tsp protease. *J Biol Chem* 270 (48): S. 28864-28868.

Keiler, K. C. und R. T. Sauer (1996): Sequence determinants of C-terminal substrate recognition by the Tsp protease. *J Biol Chem* 271 (5): S. 2589-2593.

Keiler, K. C., K. R. Silber, K. M. Downard, I. A. Papayannopoulos, K. Biemann und R. T. Sauer (1995): C-terminal specific protein degradation: activity and substrate specificity of the Tsp protease. *Protein Sci* 4 (8): S. 1507-1515.

Kleinschmidt, J. H. (2003): Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* 60 (8): S. 1547-1558.

Koch, A. L. (1998): The biophysics of the gram-negative periplasmic space. *Crit Rev Microbiol* 24 (1): S. 23-59.



- Koebnik, R. (1996): In vivo membrane assembly of split variants of the *E. coli* outer membrane protein OmpA. *Embo j* 15 (14): S. 3529-3537.
- Koide, K., K. Ito und Y. Akiyama (2008): Substrate recognition and binding by RseP, an Escherichia coli intramembrane protease. *J Biol Chem* 283 (15): S. 9562-9570.
- Koldewey, P., F. Stull, S. Horowitz, R. Martin und J. C. A. Bardwell (2016): Forces Driving Chaperone Action. *Cell* 166 (2): S. 369-379.
- Kolmar, H., P. R. Waller und R. T. Sauer (1996): The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of Escherichia coli: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J Bacteriol* 178 (20): S. 5925-5929.
- Korndörfer, I. P., M. K. Dommel und A. Skerra (2004): Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture. *Nat Struct Mol Biol* 11 (10): S. 1015-1020.
- Krojer, T., M. Garrido-Franco, R. Huber, M. Ehrmann und T. Clausen (2002): Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature* 416 (6879): S. 455-459.
- Krojer, T., J. Sawa, R. Huber und T. Clausen (2010): HtrA proteases have a conserved activation mechanism that can be triggered by distinct molecular cues. *Nat Struct Mol Biol* 17 (7): S. 844-852.
- Krojer, T., J. Sawa, E. Schäfer, H. R. Saibil, M. Ehrmann und T. Clausen (2008): Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* 453 (7197): S. 885-890.
- Kucz, N., M. Meltzer und M. Ehrmann (2006): Periplasmic Proteases. The Periplasm. M. Ehrmann, ASM Press: 150-170.
- Kwon, E., D. Y. Kim, C. A. Gross, J. D. Gross und K. K. Kim (2010): The crystal structure Escherichia coli Spy. *Protein Sci* 19 (11): S. 2252-2259.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): S. 680-685.
- Landeta, C., D. Boyd und J. Beckwith (2018): Disulfide bond formation in prokaryotes. *Nat Microbiol* 3 (3): S. 270-280.
- Lazar, S. W. und R. Kolter (1996): SurA assists the folding of Escherichia coli outer membrane proteins. *J Bacteriol* 178 (6): S. 1770-1773.
- Lee, P. A., D. Tullman-Ercek und G. Georgiou (2006): The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol* 60: S. 373-395.
- Li, G., C. He, P. Bu, H. Bi, S. Pan, R. Sun und X. S. Zhao (2018): Single-Molecule Detection Reveals Different Roles of Skp and SurA as Chaperones. *ACS Chem Biol* 13 (4): S. 1082-1089.

- Madigan, M. T., J. M. Martinko und T. D. Brock (2006). Brock Biology of Microorganisms. Upper Saddle River, NJ, USA, Pearson Prentice Hall, Inc.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, D. A. Stahl und D. P. Clark (2012). Brock Biology of Microorganisms. San Francisco, USA, Pearson Education, Inc.
- Malet, H., F. Canellas, J. Sawa, J. Yan, K. Thalassinou, M. Ehrmann, T. Clausen und H. R. Saibil (2012): Newly folded substrates inside the molecular cage of the HtrA chaperone DegQ. *Nat Struct Mol Biol* 19 (2): S. 152-157.
- Martin, J. L., J. C. Bardwell und J. Kuriyan (1993): Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo. *Nature* 365 (6445): S. 464-468.
- Matern, Y., B. Barion und S. Behrens-Kneip (2010): PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in Escherichia coli. *BMC Microbiol* 10: S. 251.
- Mayer, M. P. (2010): Gymnastics of molecular chaperones. *Mol Cell* 39 (3): S. 321-331.
- Mecenas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue und C. A. Gross (1993): The activity of sigma E, an Escherichia coli heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev* 7 (12b): S. 2618-2628.
- Meltzer, M., S. Hasenbein, P. Hauske, N. Kucz, M. Merdanovic, S. Grau, A. Beil, D. Jones, T. Krojer, T. Clausen, M. Ehrmann und M. Kaiser (2008): Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control. *Angew Chem Int Ed Engl* 47 (7): S. 1332-1334.
- Merdanovic, M., T. Clausen, M. Kaiser, R. Huber und M. Ehrmann (2011): Protein quality control in the bacterial periplasm. *Annu Rev Microbiol* 65: S. 149-168.
- Merdanovic, M., N. Mamant, M. Meltzer, S. Poepsel, A. Auckenthaler, R. Melgaard, P. Hauske, L. Nagel-Steger, A. R. Clarke, M. Kaiser, R. Huber und M. Ehrmann (2010): Determinants of structural and functional plasticity of a widely conserved protease chaperone complex. *Nat Struct Mol Biol* 17 (7): S. 837-843.
- Messens, J., J. F. Collet, K. Van Belle, E. Brosens, R. Loris und L. Wyns (2007): The oxidase DsbA folds a protein with a nonconsecutive disulfide. *J Biol Chem* 282 (43): S. 31302-31307.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Misra, R., A. Peterson, T. Ferenci und T. J. Silhavy (1991): A genetic approach for analyzing the pathway of LamB assembly into the outer membrane of Escherichia coli. *J Biol Chem* 266 (21): S. 13592-13597.
- Mogensen, J. E. und D. E. Otzen (2005): Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol* 57 (2): S. 326-346.

- Mössner, E., M. Huber-Wunderlich und R. Glockshuber (1998): Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci* 7 (5): S. 1233-1244.
- Mühlradt, P. F. und J. R. Golecki (1975): Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of *Salmonella typhimurium*. *Eur J Biochem* 51 (2): S. 343-352.
- Nagasawa, H., Y. Sakagami, A. Suzuki, H. Suzuki, H. Hara und Y. Hirota (1989): Determination of the cleavage site involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171 (11): S. 5890-5893.
- Nakatogawa, H. und K. Ito (2001): Secretion monitor, SecM, undergoes self-translation arrest in the cytosol. *Mol Cell* 7 (1): S. 185-192.
- Narita, S., C. Masui, T. Suzuki, N. Dohmae und Y. Akiyama (2013): Protease homolog BepA (YfgC) promotes assembly and degradation of beta-barrel membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (38): S. E3612-3621.
- Nikaido, H. (2003): Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67 (4): S. 593-656.
- Nikaido, H. und M. Vaara (1985): Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49 (1): S. 1-32.
- Nou, X. und R. J. Kadner (1998): Coupled changes in translation and transcription during cobalamin-dependent regulation of *btuB* expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180 (24): S. 6719-6728.
- Oberbauer, B. A. (1992). Theodor Escherich - Leben und Werk, Futuramed-Verlag.
- Otto, K. und T. J. Silhavy (2002): Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (4): S. 2287-2292.
- Overall, C. M. und C. P. Blobel (2007): In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (3): S. 245-257.
- Page, M. J. und E. Di Cera (2008): Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci* 65 (7-8): S. 1220-1236.
- Pallen, M. J. und B. W. Wren (1997): The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol* 26 (2): S. 209-221.
- Patel, G. J., S. Behrens-Kneip, O. Holst und J. H. Kleinschmidt (2009): The periplasmic chaperone Skp facilitates targeting, insertion, and folding of OmpA into lipid membranes with a negative membrane surface potential. *Biochemistry* 48 (43): S. 10235-10245.
- Price, N. L. und T. L. Raivio (2009): Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100. *J Bacteriol* 191 (6): S. 1798-1815.

- Qu, J., S. Behrens-Kneip, O. Holst und J. H. Kleinschmidt (2009): Binding regions of outer membrane protein A in complexes with the periplasmic chaperone Skp. A site-directed fluorescence study. *Biochemistry* 48 (22): S. 4926-4936.
- Qu, J., C. Mayer, S. Behrens, O. Holst und J. H. Kleinschmidt (2007): The trimeric periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* forms 1:1 complexes with outer membrane proteins via hydrophobic and electrostatic interactions. *J Mol Biol* 374 (1): S. 91-105.
- Quan, S., P. Koldewey, T. Tapley, N. Kirsch, K. M. Ruane, J. Pfizenmaier, R. Shi, S. Hofmann, L. Foit, G. Ren, U. Jakob, Z. Xu, M. Cygler und J. C. Bardwell (2011): Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy. *Nat Struct Mol Biol* 18 (3): S. 262-269.
- Rahfeld, J. U., A. Schierhorn, K. Mann und G. Fischer (1994): A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 343 (1): S. 65-69.
- Raivio, T. L., D. L. Popkin und T. J. Silhavy (1999): The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *J Bacteriol* 181 (17): S. 5263-5272.
- Raivio, T. L. und T. J. Silhavy (2001): Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* 55: S. 591-624.
- Ramm, K. und A. Plückthun (2000): The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity in vitro. *J Biol Chem* 275 (22): S. 17106-17113.
- Ramm, K. und A. Plückthun (2001): High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric *E. coli* peptidyl-prolyl-isomerase FkpA. *J Mol Biol* 310 (2): S. 485-498.
- Rawlings, N. D. und A. J. Barrett (1995): Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol* 248: S. 183-228.
- Rawlings, N. D., A. J. Barrett und A. Bateman (2010): MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38 (Database issue): S. D227-233.
- Rawlings, N. D., A. J. Barrett und A. Bateman (2011): Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *J Biol Chem* 286 (44): S. 38321-38328.
- Rhodiou, V. A., W. C. Suh, G. Nonaka, J. West und C. A. Gross (2006): Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol* 4 (1): S. e2.
- Ricci, D. P., J. Schwalm, M. Gonzales-Cope und T. J. Silhavy (2013): The activity and specificity of the outer membrane protein chaperone SurA are modulated by a proline isomerase domain. *MBio* 4 (4): S.
- Richter, K., M. Haslbeck und J. Buchner (2010): The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* 40 (2): S. 253-266.

- Ringler, P. und G. E. Schulz (2002): OmpA membrane domain as a tight-binding anchor for lipid bilayers. *Chembiochem* 3 (5): S. 463-466.
- Rizzitello, A. E., J. R. Harper und T. J. Silhavy (2001): Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183 (23): S. 6794-6800.
- Rouvière, P. E. und C. A. Gross (1996): SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* 10 (24): S. 3170-3182.
- Rowley, G., M. Spector, J. Kormanec und M. Roberts (2006): Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 4 (5): S. 383-394.
- Sachelaru, I., N. A. Petriman, R. Kudva und H. G. Koch (2014): Dynamic interaction of the sec translocon with the chaperone PpiD. *J Biol Chem* 289 (31): S. 21706-21715.
- Sambrook, J., E. F. Frisch und T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, T., K. Ito und T. Yura (1977): Membrane proteins of *Escherichia coli* K-12: two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of inner and outer membranes. *Eur J Biochem* 78 (2): S. 557-567.
- Saul, F. A., J. P. Arié, B. Vulliez-le Normand, R. Kahn, J. M. Betton und G. A. Bentley (2004): Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J Mol Biol* 335 (2): S. 595-608.
- Sawa, J., H. Malet, T. Krojer, F. Canellas, M. Ehrmann und T. Clausen (2011): Molecular adaptation of the DegQ protease to exert protein quality control in the bacterial cell envelope. *J Biol Chem* 286 (35): S. 30680-30690.
- Schiffrin, B., A. N. Calabrese, P. W. A. Devine, S. A. Harris, A. E. Ashcroft, D. J. Brockwell und S. E. Radford (2016): Skp is a multivalent chaperone of outer-membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol* 23 (9): S. 786-793.
- Silber, K. R., K. C. Keiler und R. T. Sauer (1992): Tsp: a tail-specific protease that selectively degrades proteins with nonpolar C termini. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1): S. 295-299.
- Sklar, J. G., T. Wu, D. Kahne und T. J. Silhavy (2007): Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 21 (19): S. 2473-2484.
- Smith, S. G., V. Mahon, M. A. Lambert und R. P. Fagan (2007): A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett* 273 (1): S. 1-11.

- Soltes, G. R., N. R. Martin, E. Park, H. A. Sutterlin und T. J. Silhavy (2017): Distinctive Roles for Periplasmic Proteases in the Maintenance of Essential Outer Membrane Protein Assembly. *J Bacteriol* 199 (20): S.
- Soltes, G. R., J. Schwalm, D. P. Ricci und T. J. Silhavy (2016): The Activity of Escherichia coli Chaperone SurA Is Regulated by Conformational Changes Involving a Parvulin Domain. *J Bacteriol* 198 (6): S. 921-929.
- Spiess, C., A. Beil und M. Ehrmann (1999): A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97 (3): S. 339-347.
- Srivastava, S. K., P. R. Lambadi, T. Ghosh, R. Pathania und N. K. Navani (2014): Genetic regulation of spy gene expression in Escherichia coli in the presence of protein unfolding agent ethanol. *Gene* 548 (1): S. 142-148.
- Stein, R. L. (1993): Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis-trans isomerization. *Adv Protein Chem* 44: S. 1-24.
- Stull, F., J. M. Betton und J. C. A. Bardwell (2018): Periplasmic Chaperones and Prolyl Isomerases. *EcoSal Plus* 8 (1): S.
- Stymest, K. H. und P. Klappa (2008): The periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases PpiD and SurA have partially overlapping substrate specificities. *Febs j* 275 (13): S. 3470-3479.
- Su, M. Y., N. Som, C. Y. Wu, S. C. Su, Y. T. Kuo, L. C. Ke, M. R. Ho, S. R. Tzeng, C. H. Teng, D. Mengin-Lecreux, M. Reddy und C. I. Chang (2017): Structural basis of adaptor-mediated protein degradation by the tail-specific PDZ-protease Prc. *Nat Commun* 8 (1): S. 1516.
- Surmann, K., E. Ćudić, E. Hammer und S. Hunke (2016): Molecular and proteome analyses highlight the importance of the Cpx envelope stress system for acid stress and cell wall stability in Escherichia coli. *Microbiologyopen* 5 (4): S. 582-596.
- Tadokoro, A., H. Hayashi, T. Kishimoto, Y. Makino, S. Fujisaki und Y. Nishimura (2004): Interaction of the Escherichia coli lipoprotein Nlpl with periplasmic Prc (Tsp) protease. *J Biochem* 135 (2): S. 185-191.
- Tormo, A., M. Almirón und R. Kolter (1990): surA, an Escherichia coli gene essential for survival in stationary phase. *J Bacteriol* 172 (8): S. 4339-4347.
- Turk, B. (2006): Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5 (9): S. 785-799.
- Uhland, K., M. Mondigler, C. Spiess, W. Prinz und M. Ehrmann (2000): Determinants of translocation and folding of TreF, a trehalase of Escherichia coli. *J Biol Chem* 275 (31): S. 23439-23445.
- van Wielink, J. E. und J. A. Duine (1990): How big is the periplasmic space? *Trends Biochem Sci* 15 (4): S. 136-137.

- Vertommen, D., N. Ruiz, P. Leverrier, T. J. Silhavy und J. F. Collet (2009): Characterization of the role of the Escherichia coli periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *Proteomics* 9 (9): S. 2432-2443.
- Waller, P. R. und R. T. Sauer (1996): Characterization of degQ and degS, Escherichia coli genes encoding homologs of the DegP protease. *J Bacteriol* 178 (4): S. 1146-1153.
- Walsh, N. P., B. M. Alba, B. Bose, C. A. Gross und R. T. Sauer (2003): OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* 113 (1): S. 61-71.
- Walton, T. A., C. M. Sandoval, C. A. Fowler, A. Pardi und M. C. Sousa (2009): The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (6): S. 1772-1777.
- Walton, T. A. und M. C. Sousa (2004): Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol Cell* 15 (3): S. 367-374.
- Wang, C. C. und C. L. Tsou (1998): Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes. *FEBS Lett* 425 (3): S. 382-384.
- Weininger, U., R. P. Jakob, M. Kovermann, J. Balbach und F. X. Schmid (2010): The prolyl isomerase domain of PpiD from Escherichia coli shows a parvulin fold but is devoid of catalytic activity. *Protein Sci* 19 (1): S. 6-18.
- Weski, J. (2010): Das Netzwerk der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle in E. coli. Dr. rer. nat., Universität Duisburg-Essen.
- Weski, J. und M. Ehrmann (2012): Genetic analysis of 15 protein folding factors and proteases of the Escherichia coli cell envelope. *J Bacteriol* 194 (12): S. 3225-3233.
- Weski, J., M. Meltzer, L. Spaan, T. Mönig, J. Oeljeklaus, P. Hauske, L. Vouilleme, R. Volkmer, P. Boisguerin, D. Boyd, R. Huber, M. Kaiser und M. Ehrmann (2012): Chemical biology approaches reveal conserved features of a C-terminal processing PDZ protease. *Chembiochem* 13 (3): S. 402-408.
- Wilken, C., K. Kitzing, R. Kurzbauer, M. Ehrmann und T. Clausen (2004): Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell* 117 (4): S. 483-494.
- Wülfing, C. und A. Plückthun (1994): Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 12 (5): S. 685-692.
- Wunderlich, M. und R. Glockshuber (1993): In vivo control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *J Biol Chem* 268 (33): S. 24547-24550.
- Yamashita, E., M. V. Zhalnina, S. D. Zakharov, O. Sharma und W. A. Cramer (2008): Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon. *EMBO J* 27 (15): S. 2171-2180.

Zapun, A., D. Missiakas, S. Raina und T. E. Creighton (1995): Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 34 (15): S. 5075-5089.

Zoetendal, E. G., A. H. Smith, M. A. Sundset und R. I. Mackie (2008): The BaeSR two-component regulatory system mediates resistance to condensed tannins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 74 (2): S. 535-539.



## 7 Anhang

**Tabelle 7.1: Ergebnisse der LC-MS-Analyse der Proteinreinigungen aus den Doppel-KO-Stämmen**

Dargestellt sind die Ergebnisse der LC-MS-Analysen der Proteinreinigungen aus den Deletionsmutanten sortiert nach Proteinen und Deletionsmutante. In rot ist das Gen des überproduzierten Proteins angegeben, in blau sind die Gene markiert, die in mindestens einer Fraktion mehr als 10 MS/MS Count aufweisen und in pink bzw. pink hinterlegt sind Proteine mit Disulfidbrücke (bei DsbA/DsbAPT).

DegP SA JB48 ( <i>degP dsbA</i> ) ACE_0105		DegP SA JB26 ( <i>degP ppiD</i> ) ACE_0163		DegP SA JB53 ( <i>degP tsp</i> ) ACE_0175	
Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count
<i>acrA</i>	43	<i>acrA</i>	24	<i>acrA</i>	60
<i>agp</i>	85	<i>agp</i>	40	<i>agp</i>	79
<i>bamA</i>	108	<i>bamA</i>	85	<i>ampC</i>	8
<i>bamC</i>	24	<i>btuB</i>	8	<i>bamA</i>	162
<i>bamD</i>	21	<i>dacA</i>	25	<i>bamB</i>	10
<i>btuB</i>	44	<i>dacD</i>	22	<i>bamC</i>	14
<i>cpdB</i>	18	<i>degP</i>	4717	<i>bamD</i>	21
<i>dacA</i>	44	<i>degQ</i>	134	<i>bgIX</i>	9
<i>dcrB</i>	18	<i>degS</i>	82	<i>btuB</i>	79
<i>degP</i>	3796	<i>dppA</i>	75	<i>cpdB</i>	6
<i>degQ</i>	158	<i>dsbA</i>	275	<i>cysP</i>	15
<i>dppA</i>	153	<i>fadL</i>	5	<i>dacA</i>	72
<i>fadL</i>	21	<i>fdoG</i>	45	<i>dacC</i>	20
<i>fdoG</i>	132	<i>fkpA</i>	13	<i>dacD</i>	23
<i>fhuA</i>	32	<i>flgI</i>	20	<i>dcrB</i>	14
<i>glpQ</i>	16	<i>gsiB</i>	9	<i>degP</i>	2986
<i>gltI</i>	30	<i>lamB</i>	40	<i>degQ</i>	91
<i>lamB</i>	38	<i>lpp</i>	16	<i>dppA</i>	109
<i>lpoA</i>	24	<i>lptD</i>	79	<i>dsbG</i>	6
<i>lpp</i>	29	<i>mglB</i>	3	<i>fadL</i>	15
<i>lptD</i>	129	<i>napA</i>	9	<i>fdoG</i>	69
<i>metQ</i>	30	<i>nmpC</i>	69	<i>fecA</i>	6
<i>mipA</i>	21	<i>ompA</i>	94	<i>fhuA</i>	94
<i>napA</i>	34	<i>ompC</i>	300	<i>fimA</i>	12
<i>nmpC</i>	51	<i>ompF</i>	15	<i>flgA</i>	20
<i>nrfA</i>	29	<i>ompX</i>	43	<i>flgH</i>	17
<i>ompA</i>	149	<i>opgG;mdoG</i>	15	<i>flgI</i>	28
<i>ompC</i>	231	<i>oppA</i>	67	<i>flu</i>	24
<i>ompF</i>	92	<i>pbpG</i>	33	<i>ggt</i>	13
<i>ompT</i>	32	<i>potD</i>	14	<i>glpQ</i>	21
<i>ompX</i>	52	<i>prc</i>	82	<i>gltF</i>	8
<i>opgG;mdoG</i>	47	<i>surA</i>	53	<i>gsiB</i>	26
<i>oppA</i>	125	<i>tolC</i>	13	<i>lamB</i>	157
<i>osmE</i>	20	<i>tsx</i>	7	<i>lpoA</i>	13
<i>pal</i>	19	<i>yafK</i>	22	<i>lpp</i>	35
<i>pbpG</i>	22	<i>ycfS</i>	8	<i>lptD</i>	159
<i>ppiD</i>	68	<i>ydgH</i>	8	<i>malE</i>	16

DegP SA JB48 ( <i>degP dsbA</i> ) ACE_0105		DegP SA JB26 ( <i>degP ppiD</i> ) ACE_0163		DegP SA JB53 ( <i>degP tsp</i> ) ACE_0175	
Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count
<i>proX</i>	21			<i>mepS</i>	38
<i>ma</i>	14			<i>metQ</i>	30
<i>sapA</i>	31			<i>mglB</i>	14
<i>skp</i>	8			<i>mipA</i>	21
<i>slt</i>	54			<i>miaC</i>	7
<i>slyB</i>	24			<i>mliC</i>	4
<i>tolC</i>	56			<i>mltD</i>	34
<i>treA</i>	62			<i>mppA</i>	29
<i>ugpB</i>	44			<i>nanC</i>	9
<i>yafK</i>	24			<i>napA</i>	11
<i>ybaY</i>	17			<i>nlpC</i>	8
<i>ybhC</i>	15			<i>nmpC</i>	169
<i>ybiS</i>	14			<i>ompA</i>	140
<i>ycbK</i>	23			<i>ompC</i>	464
<i>ydcS</i>	41			<i>ompF</i>	141
<i>ydgA</i>	55			<i>ompT</i>	37
<i>yfhM</i>	43			<i>ompW</i>	11
<i>ygdI</i>	10			<i>ompX</i>	89
<i>yhjJ</i>	8			<i>opgG;mdoG</i>	90
<i>yjfN</i>	6			<i>oppA</i>	124
<i>ytfQ</i>	12			<i>osmE</i>	32
				<i>pal</i>	22
				<i>pbpG</i>	37
				<i>potD</i>	16
				<i>ppiD</i>	44
				<i>proX</i>	22
				<i>sapA</i>	19
				<i>secM</i>	15
				<i>slyB</i>	21
				<i>sppA</i>	11
				<i>tamA</i>	24
				<i>tolB</i>	18
				<i>tolC</i>	26
				<i>treA</i>	21
				<i>tsx</i>	30
				<i>uidC</i>	18
				<i>yafK</i>	25
				<i>ybaY</i>	28
				<i>ybhC</i>	13
				<i>ybiS</i>	22

DegP SA JB48 ( <i>degP dsbA</i> ) ACE_0105		DegP SA JB26 ( <i>degP ppiD</i> ) ACE_0163		DegP SA JB53 ( <i>degP tsp</i> ) ACE_0175	
Gename	MS/MS Count	Gename	MS/MS Count	Gename	MS/MS Count
				<i>ybjP</i>	18
				<i>ycbK</i>	32
				<i>ycfS</i>	14
				<i>ydeN</i>	12
				<i>ydgA</i>	33
				<i>ydgH</i>	8
				<i>yfeW</i>	10
				<i>yfhM</i>	75
				<i>ygdl</i>	16
				<i>yhil</i>	18
				<i>yiaD</i>	6
				<i>yjel</i>	9
				<i>yncD</i>	12
				<i>ynhG</i>	8
				<i>yraP</i>	9

DegQ SA JB48 ( <i>degP dsbA</i> ) ACE_0163		DegQ SA JB26 ( <i>degP ppiD</i> ) ACE_0163		DegQ SA JB53 ( <i>degP tsp</i> ) ACE_0163	
Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count
<i>acrA</i>	101	<i>acrA</i>	54	<i>acrA</i>	103
<i>bamA</i>	43	<i>dacA</i>	19	<i>bamA</i>	57
<i>bamB</i>	7	<i>dcrB</i>	10	<i>bamB</i>	13
<i>bamC</i>	7	<i>degQ</i>	3755	<i>bamC</i>	22
<i>cyoA</i>	14	<i>degS</i>	51	<i>dacA</i>	117
<i>dacA</i>	64	<i>dsbA</i>	273	<i>dacC</i>	17
<i>dacC</i>	48	<i>fdoG</i>	86	<i>dcrB</i>	37
<i>dcrB</i>	23	<i>fkpA</i>	47	<i>degQ</i>	4885
<i>degQ</i>	3985	<i>hofQ</i>	3	<i>degS</i>	13
<i>degS</i>	26	<i>lpoA</i>	3	<i>dsbA</i>	193
<i>fdoG</i>	41	<i>lpp</i>	35	<i>fdoG</i>	42
<i>lpp</i>	46	<i>metQ</i>	33	<i>flu</i>	40
<i>lptD</i>	12	<i>nlpD</i>	10	<i>lpoA</i>	33
<i>metQ</i>	86	<i>ompA</i>	86	<i>lpp</i>	80
<i>nlpD</i>	5	<i>ompC</i>	88	<i>lptD</i>	14
<i>ompA</i>	187	<i>ompX</i>	10	<i>mepS</i>	7
<i>ompC</i>	97	<i>opgG;mdoG</i>	19	<i>metQ</i>	84
<i>ompT</i>	10	<i>osmY</i>	9	<i>nlpD</i>	10
<i>ompX</i>	13	<i>prc</i>	50	<i>ompA</i>	167
<i>osmE</i>	12	<i>skp</i>	21	<i>ompC</i>	112
<i>osmY</i>	7	<i>spy</i>	36	<i>osmE</i>	26
<i>pal</i>	10	<i>surA</i>	27	<i>pal</i>	32
<i>prc</i>	17	<i>ybgF</i>	2	<i>ppiD</i>	573
<i>slyB</i>	37	<i>ybhC</i>	5	<i>slyB</i>	23
<i>spy</i>	20	<i>yfhM</i>	5	<i>spy</i>	26
<i>surA</i>	17			<i>surA</i>	16
<i>tolC</i>	19			<i>ybaY</i>	8
<i>yajG</i>	5			<i>ybhC</i>	20
<i>ydgA</i>	58			<i>ydgA</i>	38
<i>yfhM</i>	12			<i>yfhM</i>	36
<i>vgdI</i>	10			<i>vgdI</i>	9

DsbA JB48 ( <i>degP dsbA</i> ) ACE_0105		DsbA JB60 ( <i>surA dsbA</i> ) ACE_0143		DsbA PT JB48 ( <i>degP dsbA</i> ) ACE_0165		DsbA PT JB60 ( <i>surA dsbA</i> ) ACE_0165	
Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count
<i>acrA</i>	65	<i>acrA</i>	113	<i>acrA</i>	36	<i>acrA</i>	55
<i>agp</i>	12	<i>alsB</i>	11	<i>agp</i>	7	<i>amiA</i>	35
<i>amiA</i>	50	<i>amiA</i>	42	<i>amiA</i>	29	<i>amiC</i>	18
<i>amiB</i>	11	<i>amiB</i>	26	<i>amiC</i>	17	<i>bamA</i>	9
<i>amiC</i>	8	<i>amiC</i>	31	<i>bamA</i>	13	<i>bamB</i>	10
<i>bamA</i>	87	<i>bamA</i>	106	<i>bamB</i>	7	<i>cpxP</i>	3
<i>bamB</i>	21	<i>bamB</i>	27	<i>bamC</i>	5	<i>cueO</i>	18
<i>bamC</i>	31	<i>bamC</i>	56	<i>cpxP</i>	16	<i>dacA</i>	17
<i>bamD</i>	16	<i>bamD</i>	16	<i>cueO</i>	14	<i>dcrB</i>	17
<i>cueO</i>	17	<i>cpxP</i>	30	<i>dacA</i>	12	<i>degP</i>	74
<i>cyoA</i>	27	<i>cueO</i>	21	<i>dcrB</i>	10	<i>degQ</i>	43
<i>dacA</i>	65	<i>dacA</i>	60	<i>degQ</i>	110	<i>dmsA</i>	9
<i>dacC</i>	46	<i>dacC</i>	47	<i>degS</i>	27	<i>dsbA</i>	754
<i>dcrB</i>	25	<i>dcrB</i>	46	<i>dsbA</i>	1592	<i>erfK</i>	8
<i>dppA</i>	15	<i>degP</i>	334	<i>fadL</i>	6	<i>fdoG</i>	27
<i>dsbA</i>	2885	<i>degQ</i>	21	<i>fdoG</i>	31	<i>flu</i>	47
<i>eco</i>	8	<i>dsbA</i>	2683	<i>fliY</i>	8	<i>lpoA</i>	8
<i>erfK</i>	12	<i>erfK</i>	14	<i>ivy</i>	32	<i>lpoB</i>	4
<i>fadL</i>	19	<i>fdnG</i>	21	<i>lpoA</i>	7	<i>lpp</i>	55
<i>fdoG</i>	126	<i>fdoG</i>	156	<i>lpp</i>	64	<i>metQ</i>	20
<i>fliY</i>	26	<i>fkpA</i>	43	<i>metQ</i>	21	<i>napA</i>	18
<i>glpQ</i>	17	<i>fliY</i>	34	<i>mIaC</i>	13	<i>ompA</i>	126
<i>ivy</i>	49	<i>flu</i>	35	<i>mIaD</i>	28	<i>ompC</i>	40
<i>lpoA</i>	19	<i>glnH</i>	25	<i>napA</i>	27	<i>ompX</i>	13
<i>lpp</i>	52	<i>glpQ</i>	37	<i>nlpD</i>	10	<i>opgG;mdoG</i>	32
<i>lptD</i>	31	<i>hisJ</i>	10	<i>ompA</i>	127	<i>osmY</i>	11
<i>mepS</i>	11	<i>ivy</i>	51	<i>ompC</i>	41	<i>pal</i>	15
<i>metQ</i>	53	<i>lolB</i>	7	<i>ompX</i>	17	<i>potD</i>	8
<i>mglB</i>	6	<i>lpoA</i>	52	<i>opgG;mdoG</i>	32	<i>ppiD</i>	24
<i>mIaC</i>	27	<i>lpoB</i>	9	<i>osmE</i>	21	<i>rbsB</i>	10
<i>mIaD</i>	26	<i>lpp</i>	67	<i>osmY</i>	65	<i>skp</i>	31
<i>napA</i>	61	<i>lptA</i>	21	<i>pal</i>	9	<i>slyB</i>	20
<i>nlpD</i>	13	<i>metQ</i>	92	<i>potD</i>	17	<i>spy</i>	116
<i>ompA</i>	164	<i>mIaC</i>	57	<i>ppiD</i>	22	<i>tolB</i>	18
<i>ompC</i>	88	<i>napA</i>	43	<i>prc</i>	10	<i>tolC</i>	6
<i>ompF</i>	29	<i>nlpD</i>	20	<i>proX</i>	14	<i>ybhC</i>	16
<i>ompT</i>	23	<i>ompA</i>	285	<i>rbsB</i>	17	<i>ybjP</i>	17
<i>ompX</i>	30	<i>ompC</i>	14	<i>skp</i>	17	<i>ydgA</i>	15
<i>opgD;mdoD</i>	8	<i>ompT</i>	18	<i>slyB</i>	12	<i>ydgH</i>	16
<i>opgG;mdoG</i>	78	<i>ompX</i>	15	<i>sodC</i>	11	<i>ygdl</i>	10
<i>osmE</i>	49	<i>opgG;mdoG</i>	37	<i>spy</i>	186	<i>yhhA</i>	26
<i>osmF</i>	8	<i>oppA</i>	66	<i>surA</i>	180		
<i>osmY</i>	58	<i>osmE</i>	35	<i>tolB</i>	18		
<i>pal</i>	27	<i>osmY</i>	45	<i>tolC</i>	18		
<i>potD</i>	16	<i>pal</i>	35	<i>ybaY</i>	19		
<i>ppiD</i>	54	<i>potD</i>	73	<i>ybhC</i>	10		
<i>prc</i>	14	<i>ppiD</i>	42	<i>ybiS</i>	23		
<i>proX</i>	63	<i>prc</i>	32	<i>ybjP</i>	77		

<b>DsbA</b> JB48 ( <i>degP dsbA</i> ) ACE_0105		<b>DsbA</b> JB60 ( <i>surA dsbA</i> ) ACE_0143		<b>DsbA PT</b> JB48 ( <i>degP dsbA</i> ) ACE_0165		<b>DsbA PT</b> JB60 ( <i>surA dsbA</i> ) ACE_0165	
Gencode	MS/MS Count	Gencode	MS/MS Count	Gencode	MS/MS Count	Gencode	MS/MS Count
<i>rbsB</i>	31	<i>proX</i>	20	<i>ydcP</i>	10		
<i>slyB</i>	26	<i>rbsB</i>	63	<i>ydel</i>	13		
<i>spy</i>	134	<i>ripA</i>	48	<i>ydgA</i>	45		
<i>surA</i>	18	<i>rseB</i>	6	<i>ydgH</i>	13		
<i>tolB</i>	36	<i>sapA</i>	16	<i>ygdI</i>	27		
<i>tolC</i>	28	<i>skp</i>	54	<i>yhhA</i>	55		
<i>tsx</i>	13	<i>slyB</i>	35	<i>ypfG</i>	9		
<i>wcaM</i>	13	<i>spy</i>	126	<i>yraP</i>	2		
<i>yajG</i>	17	<i>tolB</i>	50	<i>zraP</i>	35		
<i>ybaY</i>	38	<i>tolC</i>	20				
<i>ybhC</i>	23	<i>yajG</i>	29				
<i>ybhG</i>	12	<i>ybaY</i>	19				
<i>ybiS</i>	25	<i>ybhC</i>	53				
<i>ybjP</i>	22	<i>ybhG</i>	13				
<i>ydcP</i>	23	<i>ybiS</i>	42				
<i>ydel</i>	16	<i>ydcL</i>	28				
<i>ydeN</i>	16	<i>ydcP</i>	11				
<i>ydgA</i>	69	<i>ydgA</i>	46				
<i>ydgH</i>	24	<i>ydgH</i>	76				
<i>yfhM</i>	57	<i>yedD</i>	10				
<i>ygdI</i>	29	<i>ygdI</i>	9				
<i>ygiM</i>	11	<i>ygiM</i>	5				
<i>yhhA</i>	70	<i>yhhA</i>	50				
<i>yhil</i>	8	<i>yiaD</i>	10				
<i>ynhG</i>	31	<i>yjel</i>	11				
<i>yraP</i>	10	<i>ynhG</i>	40				
<i>zraP</i>	33	<i>yraP</i>	28				

SurA JB60 ( <i>surA dsbA</i> ) ACE_0165		SurA JB63 ( <i>surA ptrA</i> ) ACE_0165		SurA JB65 ( <i>surA yfgC</i> ) ACE_0165	
Gename	MS/MS Count	Gename	MS/MS Count	Gename	MS/MS Count
<i>amiA</i>	19	<i>acrA</i>	7	<i>amiA</i>	24
<i>cueO</i>	29	<i>amiA</i>	46	<i>cueO</i>	40
<i>degP</i>	34	<i>amiB</i>	5	<i>degP</i>	56
<i>degQ</i>	125	<i>amiC</i>	14	<i>degQ</i>	267
<i>degS</i>	20	<i>bamA</i>	29	<i>degS</i>	6
<i>flu</i>	6	<i>cueO</i>	48	<i>fdoG</i>	19
<i>napA</i>	84	<i>degP</i>	90	<i>lpp</i>	21
<i>ompA</i>	119	<i>degQ</i>	209	<i>napA</i>	35
<i>opgG;mdoG</i>	29	<i>degS</i>	48	<i>ompA</i>	94
<i>osmY</i>	58	<i>dsbA</i>	112	<i>opgG;mdoG</i>	29
<i>skp</i>	10	<i>fdoG</i>	33	<i>osmY</i>	21
<i>spy</i>	415	<i>ivy</i>	34	<i>spy</i>	176
<i>surA</i>	497	<i>lpp</i>	39	<i>surA</i>	800
<i>ydcP</i>	35	<i>napA</i>	42	<i>ydcP</i>	46
<i>yhhA</i>	69	<i>ompA</i>	158	<i>zraP</i>	11
		<i>ompC</i>	14		
		<i>opgG;mdoG</i>	32		
		<i>osmY</i>	54		
		<i>ppiD</i>	10		
		<i>skp</i>	25		
		<i>spy</i>	270		
		<i>surA</i>	1431		
		<i>tolB</i>	11		
		<i>ybiS</i>	9		
		<i>ydcP</i>	45		
		<i>yhhA</i>	29		
		<i>ynhG</i>	7		
		<i>zraP</i>	20		

Prc SA JB53 ( <i>degP tsp</i> ) ACE_0143		PpiD (peripl. Domäne) JB26 ( <i>degP ppiD</i> ) ACE_0163		PtrA EQ JB63 ( <i>surA ptrA</i> ) ACE_0201		BepA EQ JB65 ( <i>surA yfgC</i> ) ACE_0222	
Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count	Genname	MS/MS Count
<i>acrA</i>	8	<i>amiB</i>	24	<i>acrA</i>	7	<i>acrA</i>	33
<i>amiB</i>	53	<i>dsbA</i>	222	<i>degP</i>	92	<i>amiA</i>	101
<i>amiC</i>	19	<i>fkpA</i>	9	<i>degS</i>	396	<i>ansB</i>	33
<i>cpxP</i>	12	<i>lpp</i>	17	<i>dsbA</i>	28	<i>bepA</i>	5295
<i>cueO</i>	19	<i>napA</i>	28	<i>fhuA</i>	15	<i>degP</i>	242
<i>fdoG</i>	26	<i>opgG;mdoG</i>	12	<i>lamB</i>	10	<i>degS</i>	161
<i>fkpA</i>	33	<i>ppiD</i>	3781	<i>lpp</i>	6	<i>dsbA</i>	405
<i>ivy</i>	27	<i>prc</i>	50	<i>lptD</i>	14	<i>fkpA</i>	31
<i>lpp</i>	66	<i>skp</i>	24	<i>mepS</i>	23	<i>ivy</i>	21
<i>lptA</i>	11	<i>spy</i>	71	<i>ompA</i>	17	<i>lpp</i>	26
<i>lptD</i>	8	<i>surA</i>	41	<i>ompC</i>	8	<i>napA</i>	58
<i>malM</i>	9	<i>ydcP</i>	15	<i>ptrA</i>	3109	<i>ompA</i>	52
<i>nlpD</i>	21			<i>skp</i>	15	<i>osmE</i>	6
<i>nrfA</i>	16			<i>ydbJ</i>	5	<i>osmY</i>	82
<i>ompA</i>	104					<i>pliG</i>	26
<i>ompC</i>	19					<i>proX</i>	17
<i>ompX</i>	10					<i>skp</i>	30
<i>opgG;mdoG</i>	233					<i>spy</i>	234
<i>osmY</i>	17					<i>tolB</i>	42
<i>prc</i>	3799					<i>zraP</i>	9
<i>rna</i>	10						
<i>skp</i>	111						
<i>spy</i>	102						
<i>tolB</i>	18						
<i>ybiS</i>	31						
<i>ydgA</i>	6						
<i>ydgH</i>	75						
<i>yhhA</i>	18						
<i>viaD</i>	30						



## **8 Danksagung**

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



## 9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Yvonne van Bürk

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

Yvonne van Bürk

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Analyse der Proteinqualitätskontrolle in der bakteriellen Zellhülle von *E. coli*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Yvonne van Bürk befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Michael Ehrmann

## 10 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten