

**Strukturbiologische Charakterisierung  
des ABC-Transporters LmrA aus *L. lactis* und  
des Substratbindeproteins EhuB aus *S. meliloti***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Nils Hanekop**  
aus Göttingen

Frankfurt 2006  
(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Tampé

2. Gutachter: Prof. Dr. L. Schmitt

Datum der Disputation:

## Zusammenfassung

ATP-binding cassette (ABC) Transporter sind ubiquitäre Membranproteine, die die Hydrolyse von ATP in der Regel an die Translokation unterschiedlichster Substrate über biologische Membranen koppeln. Sie bilden eine der größten Familien von aktiven Transportern, werden in allen drei Reichen des Lebens gefunden und sind an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge beteiligt. Auf Grund ihrer zentralen Bedeutung für viele zelluläre Prozesse wurden in der hier vorliegenden Arbeit ausgewählte ABC-Transporter bzw. ihre Komponenten strukturell untersucht, mit dem Ziel einen Beitrag zur Aufklärung ihrer molekularen Mechanismen zu leisten.

Das erste untersuchte System war der MDR-ABC-Transporter LmrA aus *L. lactis*, der auf Grund seiner funktionalen Austauschbarkeit mit dem humanen P-Glykoprotein ein geeignetes Modellsystem zur strukturellen Untersuchung dieser medizinisch relevanten Klasse von ABC-Transportern darstellte. In einem ersten Schritt zu seiner Kristallisation wurde durch die Analyse von 43 Protein-Detergens-Kombinationen eine für strukturelle Untersuchungen geeignete Proteinpräparation etabliert. Unter Verwendung von FOS-CHOLINE-16 wurde eine bis zur Homogenität gereinigte, monodisperse und stabile Proteinlösung zur Kristallisation gewonnen, mit der eine breit angelegte Analyse des n-dimensionalen Kristallisationsraums von LmrA durchgeführt wurde. Im Zuge der Analyse von insgesamt 9600 Bedingungen wurden vier verschiedene Kristallformen erhalten. Die Datenaufnahme lieferte für die Kristallform 2 unter Verwendung von Synchrotronstrahlung eine schwache Streuung bis zu einer Auflösung von 20 Å.

In einem weiteren Projekt wurden die molekularen Grundlagen der Substratspezifität des ABC-Importers Ehu aus *S. meliloti* untersucht. Hierfür wurde die Kristallstruktur seines Substratbindeproteins EhuB im Komplex mit den kompatiblen Soluten Ectoin bzw. Hydroxyectoin mit einer Auflösung von 1,9 Å bzw. 2,5 Å gelöst. Die beiden erhaltenen Strukturen zeigten einen für Substratbindeproteine der Gruppe II typischen Aufbau aus zwei globulären Domänen, die durch zwei Segmente der Polypeptidkette verbunden wurden. Die Substratbindungsstelle von EhuB war, wie für Substratbindeproteine erwartet, in der Spalte zwischen den beiden globulären Domänen lokalisiert. Ihre Analyse zeigte eine Interaktion des Proteins mit der negativ geladenen Carboxylat-Gruppe der Substrate durch die Bildung von Salzbrücken mit der Seitenkette von Arg<sup>85</sup> sowie mittels Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hauptketten-Stickstoffatomen von Phe<sup>80</sup> und Thr<sup>133</sup>. Im Unterschied dazu waren für die Bindung des kationischen Anteils der Substrate wesentlich seine Wechselwirkungen mit den aromatischen Resten Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> verantwortlich, die durch ihre räumliche Anordnung eine optimale Bindungsstelle für die delokalisierte positive Ladung der Substrate bildeten. Die Bedeutung dieser wahrscheinlich auf Kation- $\pi$  und van der Waals Interaktionen beruhenden Wechselwirkungen für die Substratbindung konnten – aufbauend auf der Kristallstruktur – in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. E. Bremer (Universität Marburg)

bestätigt werden. Neben den beschriebenen Interaktionen wurde der kationische Anteil der Substrate durch zwei Salzbrücken mit der Seitenkette von Glu<sup>21</sup> sowie durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hauptketten-Carbonyl-Funktion von Gly<sup>78</sup> gebunden. Bei der Bindung des Substrats Hydroxyectoin wurde im Vergleich zu Ectoin eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette von Glu<sup>134</sup> und der lediglich in diesem Substrat vorhandenen Hydroxyl-Gruppe beobachtet, die für die dreieinhalbfach höhere Bindungsaffinität von EhuB für Hydroxyectoin gegenüber Ectoin verantwortlich zu sein scheint.

Der Vergleich der an der Substratbindung beteiligten Interaktionen in EhuB mit den ebenfalls für kompatible Solute spezifischen Substratbindeproteinen ProX aus *E. coli*, ProX aus *A. fulgidus* und OpuAC aus *B. subtilis* enthüllte gemeinsame Prinzipien der untersuchten Proteine zur Bindung dieser Klasse von Substraten. Von besonderer Bedeutung waren dabei die von bestimmten aromatischen Resten ausgehenden Wechselwirkungen mit dem kationischen Anteil der Substrate, die wahrscheinlich auf Kation- $\pi$  und van der Waals Interaktionen beruhen. Im Detail zeigten die Substratbindungsstellen der untersuchten Proteine jedoch signifikante Unterschiede, die eine Anpassung an die für ihre Aufgabe benötigte Bindungsaffinität und das zu bindende Substrat zu sein scheinen.

## Inhaltsverzeichnis

|          |                                                                                    |           |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung .....</b>                                                            | <b>1</b>  |
| 1.1      | ATP-binding cassette Transporter .....                                             | 1         |
| 1.1.1    | Bauplan der ABC-Transporter .....                                                  | 2         |
| 1.1.2    | Struktur der Nukleotid-bindenden Domäne .....                                      | 4         |
| 1.1.3    | Struktur vollständiger ABC-Transporter .....                                       | 7         |
| 1.1.4    | Substratbindeproteine .....                                                        | 10        |
| 1.1.5    | Struktur der Substratbindeproteine .....                                           | 11        |
| 1.2      | „multidrug resistance“ .....                                                       | 12        |
| 1.2.1    | Der MDR-ABC-Transporter P-Glykoprotein.....                                        | 13        |
| 1.2.2    | Der MDR-ABC-Transporter LmrA.....                                                  | 15        |
| 1.2.3    | Röntgenstrukturanalyse von Membranproteinen – eine besondere Herausforderung ..... | 17        |
| 1.3      | Osmoadaptation von Mikroorganismen .....                                           | 17        |
| 1.3.1    | Osmoadaptation in <i>S. meliloti</i> .....                                         | 18        |
| 1.3.2    | Der ABC-Transporter Ehu und seine Komponenten.....                                 | 18        |
| 1.4      | Motivation und Zielsetzung.....                                                    | 19        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden .....</b>                                                 | <b>21</b> |
| 2.1      | Material.....                                                                      | 21        |
| 2.1.1    | Chemikalien.....                                                                   | 21        |
| 2.1.2    | Enzyme und Standards .....                                                         | 24        |
| 2.1.3    | Mikroorganismen, Plasmide und Medien.....                                          | 24        |
| 2.1.4    | Puffer und Lösungen .....                                                          | 25        |
| 2.1.5    | Chromatographische Medien und Verbrauchsmaterialien .....                          | 26        |
| 2.1.6    | Instrumente und Geräte .....                                                       | 26        |
| 2.2      | Mikrobiologische Methoden .....                                                    | 27        |
| 2.2.1    | Das Expressionssystem .....                                                        | 27        |
| 2.2.2    | Herstellung von Stammkulturen.....                                                 | 27        |
| 2.2.3    | Übernachtkultur von <i>L. lactis</i> .....                                         | 27        |
| 2.2.4    | Herstellung von Nisin.....                                                         | 27        |
| 2.2.5    | Expression von LmrA in <i>L. lactis</i> .....                                      | 28        |
| 2.3      | Biochemische Methoden .....                                                        | 28        |
| 2.3.1    | Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....                                        | 28        |
| 2.3.2    | Konzentrierung von Proteinlösungen .....                                           | 29        |
| 2.3.3    | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....                                          | 29        |
| 2.3.4    | Analytische Reinigung von LmrA.....                                                | 30        |
| 2.3.5    | Präparative Reinigung von LmrA .....                                               | 32        |
| 2.3.6    | Analytische Gelfiltrationschromatographie.....                                     | 33        |
| 2.3.7    | Bestimmung der ATPase-Aktivität .....                                              | 33        |
| 2.4      | Kristallographische Methoden.....                                                  | 34        |
| 2.4.1    | Physikalische Grundlagen der Kristallisation .....                                 | 34        |
| 2.4.2    | Kristallisation von EhuB im Komplex mit einem seiner Substrate.....                | 38        |
| 2.4.3    | Kristallisation von Selenomethionin-markiertem EhuB.....                           | 38        |
| 2.4.4    | Kristallisation von LmrA.....                                                      | 38        |

|          |                                                                                         |            |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.4.5    | Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse .....                                             | 39         |
| 2.4.6    | Kryokristallographie .....                                                              | 61         |
| 2.4.7    | Datenaufnahme und Prozessierung .....                                                   | 62         |
| 2.4.8    | Strukturbestimmung von EhuB im Komplex mit Ectoin .....                                 | 63         |
| 2.4.9    | Strukturbestimmung von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin.....                           | 65         |
| 2.4.10   | Analyse der Strukturmodelle .....                                                       | 66         |
| 2.4.11   | Graphische Darstellung .....                                                            | 66         |
| 2.4.12   | Überlagerung von Proteinstrukturen .....                                                | 66         |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>                                                                 | <b>67</b>  |
| 3.1      | Der MDR-ABC-Transporter LmrA.....                                                       | 67         |
| 3.1.1    | Homologe Expression von LmrA in <i>L. lactis</i> .....                                  | 67         |
| 3.1.2    | Charakterisierung verschiedener LmrA Präparationen .....                                | 67         |
| 3.1.3    | Reinigung von LmrA aus <i>L. lactis</i> .....                                           | 77         |
| 3.1.4    | Kristallisation .....                                                                   | 78         |
| 3.2      | Das Substratbindeprotein EhuB .....                                                     | 82         |
| 3.2.1    | Kristallisation .....                                                                   | 82         |
| 3.2.2    | Datenaufnahme und Prozessierung .....                                                   | 84         |
| 3.2.3    | Das Phasenproblem .....                                                                 | 86         |
| 3.2.4    | Strukturbestimmung von EhuB im Komplex mit Ectoin .....                                 | 88         |
| 3.2.5    | Strukturbestimmung von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin.....                           | 91         |
| 3.2.6    | Die Struktur von EhuB im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin.....                     | 92         |
| 3.2.7    | Die Substratbindungsstelle von EhuB .....                                               | 97         |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>                                                                  | <b>103</b> |
| 4.1      | Der MDR-ABC-Transporter LmrA.....                                                       | 103        |
| 4.1.1    | Die Eignung verschiedener LmrA Präparationen für die Kristallisation .....              | 104        |
| 4.1.2    | Die Reinigung von LmrA aus <i>L. lactis</i> .....                                       | 106        |
| 4.1.3    | Die Kristallisation des MDR-ABC-Transporters LmrA .....                                 | 106        |
| 4.1.4    | Ausblick.....                                                                           | 107        |
| 4.2      | Das Substratbindeprotein EhuB .....                                                     | 109        |
| 4.2.1    | Molekulare Grundlagen der Substratspezifität von EhuB.....                              | 109        |
| 4.2.2    | Struktureller Vergleich von kompatible Solute bindenden<br>Substratbindeproteinen ..... | 112        |
| 4.2.3    | Molekulare Grundlagen der Bindung von kompatiblen Soluten.....                          | 116        |
| 4.2.4    | Ausblick.....                                                                           | 119        |
| <b>5</b> | <b>Literatur .....</b>                                                                  | <b>120</b> |
| <b>6</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                                      | <b>130</b> |

## 1 Einleitung

Biologische Membranen sind ein essentieller Bestandteil aller Zellen. Sie grenzen die Zelle in Gestalt der Plasmamembran gegenüber ihrer Umgebung ab und ermöglichen auf diese Weise die lebenswichtige Verschiedenartigkeit von Zytosol und extrazellulärem Milieu. In Eukaryoten sind Membranen weiterhin für die Kompartimentierung der Zelle verantwortlich, die die Voraussetzung für eine Vielzahl wichtiger zellulärer Vorgänge (z.B. Energiegewinnung) ist. Biologische Membranen, die hochorganisierte Aggregate von Lipiden und Proteinen sind (Singer und Nicolson, 1972), stellen dabei keine unpassierbaren Barrieren sondern hochselektive Permeabilitätsschranken dar. Die selektive Permeabilität der Membranen beruht im Wesentlichen auf bestimmten Membranproteinen, die auf Grund ihrer Triebkraft in zwei Kategorien eingeteilt werden. Die erste Gruppe von Membranproteinen ermöglicht die passive Diffusion von bestimmten Molekülen entlang ihres elektrochemischen Gradienten. Im Unterschied dazu katalysieren die Membranproteine der zweiten Kategorie den energieabhängigen, aktiven Transport ihrer Substrate entgegen eines elektrochemischen Gradienten. Die Letzteren werden auf Basis ihrer Energiequelle in primär und sekundär aktive Transporter unterschieden. Die primär aktiven Transporter beziehen ihre Energie dabei direkt aus der ATP-Hydrolyse, während sich die sekundär aktiven Transporter der elektrochemischen Triebkraft eines Ionengradienten bedienen. Innerhalb der für eine Vielzahl von zellulären Vorgängen wichtigen Klasse der aktiven Transporter bilden die ATP-binding cassette (ABC) Transporter eine der größten Proteinfamilien (Higgins und Linton, 2003).

### 1.1 ATP-binding cassette Transporter

ABC-Transporter sind integrale Membranproteine, die in allen drei Reichen des Lebens gefunden werden und die die Hydrolyse von ATP in der Regel an den Transport ihrer Substrate über die Membran koppeln (Ames et al., 1990; Higgins, 1992). Sie sind an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge beteiligt und die von ihnen gebildete Proteinfamilie zeichnet sich durch ein breites Spektrum der von ihren Vertretern transportierten Substanzen aus. Das Substratspektrum der ABC-Transporter reicht von Ionen, über Zucker, Aminosäuren, Vitaminen, Peptiden, Polysacchariden, Lipiden und Xenobiotika bis hin zu Proteinen mit einem Molekulargewicht von 800 kDa (Holland und Blight, 1999; Holland et al., 2005).

Im Menschen sind ABC-Transporter beispielweise an der adaptiven Immunabwehr (Schmitt und Tampe, 2000) ebenso beteiligt wie an der Freisetzung von Insulin (Matsuo et al., 2003). Mutationen in einigen der 48 humanen ABC-Transporter (Dean und Allikmets, 2001) sind, wie Tab. 1.1 zeigt, aber auch die Grundlage für Erbkrankheiten unter ihnen Mukoviszidose, Adrenoleukodystrophie, Dubin-Johnson Syndrom und Wegener Granulomatose. Weiterhin ist die Überexpression von bestimmten ABC-Transportern, wie dem humanen P-Glykoprotein

(P-gp, MDR1, ABCB1), eine der Grundlagen für die als „multidrug resistance“ bezeichnete Resistenz maligner Tumore gegen eine Chemotherapie.

| ABC-Transporter | Erbkrankheit          | Transportsubstrat    |
|-----------------|-----------------------|----------------------|
| ABCA1           | Tangier-Syndrom       | Cholesterol          |
| ABCA4           | Stargardt-Syndrom     | Retinal              |
| ABCB2/3 (TAP)   | Wegener-Granulomatose | Peptide              |
| ABCC2 (MRP2)    | Dubin-Johnson-Syndrom | Glutathion-Konjugate |
| ABCC7 (CFTR)    | Mukoviszidose         | Chlorid-Ionen        |
| ABCD1           | Adrenoleukodystrophie |                      |

Tab. 1.1: Ausgewählte Erbkrankheiten durch Mutationen in ABC-Transportern. Gezeigt sind humane ABC-Transporter, deren Mutationen Erbkrankheiten auslösen, sowie deren Transportsubstrate.

Allgemein können ABC-Transporter auf Basis ihrer Transportrichtung in Importer und Exporter unterteilt werden, wobei Erstere ihre Substrate in das Zytoplasma transportieren, während die Letzteren sie aus dem Zytoplasma in den Extrazellulärraum oder in ein anderes Zellkompartiment verbringen. Eine Ausnahme hiervon bilden die Exporter, die ihre Substrate aus der mitochondrialen Matrix heraustransportieren, da diese in Bezug auf den Symbionten dem Zytoplasma entspricht. Die Einteilung der ABC-Transporter in Importer und Exporter wird bei näherer Betrachtung verständlich, da bei den Ersteren das Transportsubstrat und die Energiequelle auf unterschiedlichen Seiten der Membran lokalisiert sind, während sie bei den Letzteren auf der selben Seite vorliegen. Im Unterschied zu den Exportern benötigen die ausschließlich bei Prokaryonten vorkommenden Importer für ihre Funktion eine zusätzliche extrazelluläre Komponente, ein so genanntes Substratbindeprotein. Dieses Protein hat die Aufgabe das Substrat zu binden und an den in der Membran lokalisierten Transporter weiterzugeben.

Die große Mehrheit der bisher charakterisierten ABC-Transporter sind aktive Transporter, jedoch existieren Vertreter dieser Proteinfamilie, die keine solche Funktion besitzen. Der „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR, ABCC7) beispielweise hat keine aktive Transportfunktion, sondern stellt einen Nukleotid-regulierten Ionenkanal dar (Hanrahan et al., 2003). In ähnlicher Weise kontrolliert der „sulfonyleurea receptor 1“ (SUR1, ABCC8) die Öffnungswahrscheinlichkeit eines Ionenkanals (Matsuo et al., 2003).

### 1.1.1 Bauplan der ABC-Transporter

ABC-Transporter zeigen, wie bereits beschrieben, große Unterschiede in Bezug auf ihre Transportsubstrate und die Richtung des Transports. Dennoch besitzen sie, wie schon früh erkannt wurde (Higgins et al., 1986), einen gemeinsamen zugrunde liegenden Bauplan. Dieser beschreibt ABC-Transporter mit einer modularen Architektur, bei der ein funktionaler Transporter von zwei Nukleotid-bindenden Domänen (NBDs) und zwei Transmembrandomänen (TMDs) gebildet wird (Higgins, 1992). In einem ABC-Transporter können diese vier Domänen auf verschiedenste Weisen kombiniert werden. In Prokaryonten beispielsweise sind die einzelnen Domänen häufig auf separaten Polypeptidketten lokalisiert. Im Gegensatz dazu

sind die vier Domänen bei Eukaryonten vielfach in einer Polypeptidkette fusioniert, wobei die NBDs normalerweise Carboxy-terminal von den TMDs lokalisiert sind (Jones und George, 2004). Die so genannten „half size“ Transporter, bei denen eine TMD und eine NBD fusioniert sind, nehmen eine Mittelstellung zwischen den beiden Extremen ein. In der Familie der ABC-Transporter werden jedoch fast alle erdenklichen Domänenkombinationen zwischen den beiden Extremen gefunden, von denen einige in Abb. 1.1 schematisch dargestellt sind.

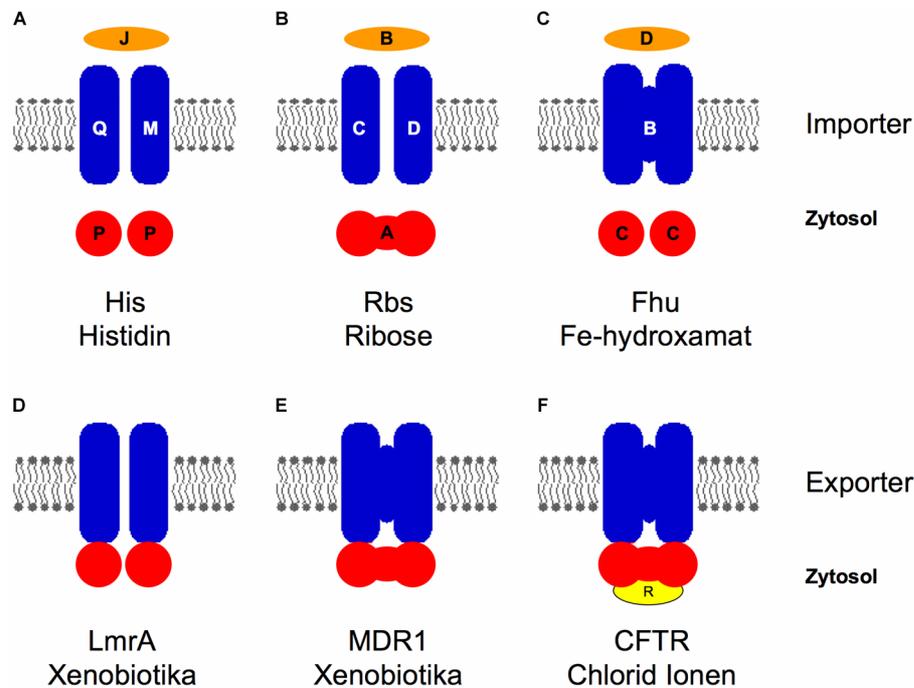


Abb. 1.1: Domänenorganisation von ABC-Transportern. Beispielhaft sind dargestellt (A) der in vier (fünf mit dem Substratbindeprotein) getrennten Untereinheiten organisierte Histidin-Transporter, (B) der aus fusionierten NBDs und separaten TMDs bestehende Ribose-Transporter, (C) der aus getrennten NBDs und fusionierten TMDs bestehende Eisen-Hydroxamat-Transporter, (D) der aus zwei TMD-NBD Kombinationen bestehende MDR-ABC-Transporter LmrA, (E) der aus einer Polypeptidkette mit vier Domänen bestehende MDR-ABC-Transporter MDR1 (P-gp, ABCB1) und (F) der aus fusionierten Domänen sowie einer zusätzlichen regulatorischen Domäne bestehende ABC-Transporter CFTR (ABCC7).

Die NBDs sind, wie schon früh gezeigt werden konnte, für die Bindung (Higgins et al., 1985; Hobson et al., 1984) und Hydrolyse von ATP sowie deren Kopplung an den Transportprozess (Bishop et al., 1989; Mimmack et al., 1989) verantwortlich. Sie besitzen – unabhängig von ihrem prokaryontischen bzw. eukaryontischen Ursprung oder dem Substrat des Transporters – ein hohes Maß an Sequenzidentität und sind durch einige charakteristische Sequenzmotive gekennzeichnet (Higgins et al., 1986). Dieses sind einerseits die für eine Vielzahl von ATPasen typischen Walker A (G-X-X-(G)-X-G-K-S-T, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt) und B ( $\phi$ - $\phi$ - $\phi$ - $\phi$ -D, wobei  $\phi$  eine hydrophobe Aminosäure darstellt) Motive (Walker et al., 1982) sowie andererseits das für ABC-Transporter charakteristische C-Schleifen (L-S-G-G-Q) Motiv (Bianchet et al., 1997), das auch als ABC Signaturmotiv bezeichnet wird. Neben den beschriebenen Motiven existieren in NBDs mit der D-Schleife, der H-Schleife und der Q-Schleife weitere charakteristische Sequenzmotive.

Im Gegensatz zu den NBDs zeigen die TMDs, die den Weg für die Translokation der Substrate bereitstellen, nur dann ein signifikantes Maß an Sequenzhomologie, wenn sie chemisch verwandte Substanzen in derselben Richtung über die Membran transportieren (Saurin et al.,

1999). Eine Ausnahme bildet das sogenannte EAA-Motiv, das sich in der vierten zytoplasmatischen Schleife fast aller TMDs von ABC-Transportern befindet, die eine Importfunktion ausüben (Mourez et al., 1997).

### 1.1.2 Struktur der Nukleotid-bindenden Domäne

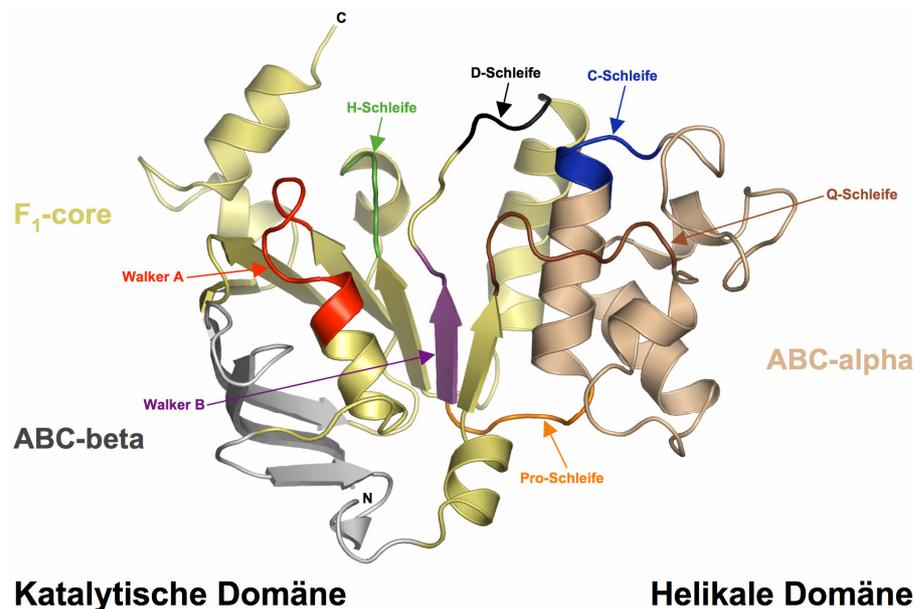
Im Jahre 1998 wurde die erste Kristallstruktur einer isolierten NBD (Hung et al., 1998) beschrieben und seitdem sind die dreidimensionalen Strukturen einer Reihe weiterer isolierter NBDs in unterschiedlichen funktionalen Zuständen bestimmt worden, die wesentlich zum Verständnis des molekularen Mechanismus der ABC-Transporter beigetragen haben. Neben den Strukturen von isolierten NBDs sind in den letzten Jahren auch jene von vier vollständigen ABC-Transportern aufgeklärt worden (Chang, 2003; Chang und Roth, 2001; Locher et al., 2002; Reyes und Chang, 2005). Eine Liste ausgewählter Kristallstrukturen von vollständigen ABC-Transportern bzw. ihren isolierten NBDs findet sich, unter Angabe des funktionalen Zustands, in Tab. 1.2.

| vollständige Transporter ( <i>Organismus</i> ) | Ligand                                                                   | Referenz                  |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| BtuCD ( <i>E. coli</i> )                       | Cyclotetranavat                                                          | (Locher et al., 2002)     |
| MsbA ( <i>E. coli</i> )                        | Nukleotid frei                                                           | (Chang und Roth, 2001)    |
| MsbA ( <i>S. typhimurium</i> )                 | ADP*V <sub>i</sub>                                                       | (Reyes und Chang, 2005)   |
| MsbA ( <i>V. cholera</i> )                     | Nukleotid frei                                                           | (Chang, 2003)             |
| isolierte NBDs ( <i>Organismus</i> )           | Ligand                                                                   | Referenz                  |
| CFTR ( <i>M. musculus</i> )                    | Nukleotid frei                                                           | (Lewis et al., 2004)      |
| N-Terminale NBD                                | ADP/Mg <sup>2+</sup><br>ATP/Mg <sup>2+</sup><br>AMP-PNP/Mg <sup>2+</sup> |                           |
| GlcV ( <i>S. solfataricus</i> )                | Nukleotid frei<br>ADP/Mg <sup>2+</sup><br>AMP-PNP/Mg <sup>2+</sup>       | (Verdon et al., 2003a)    |
| GlcV G144A ( <i>S. solfataricus</i> )          | Nukleotid frei                                                           | (Verdon et al., 2003b)    |
| HisP ( <i>S. typhimurium</i> )                 | ATP                                                                      | (Hung et al., 1998)       |
| HlyB ( <i>E. coli</i> )                        | Nukleotid frei                                                           | (Schmitt et al., 2003)    |
| HlyB H662A ( <i>E. coli</i> )                  | ATP/Mg <sup>2+</sup>                                                     | (Zaitseva et al., 2005a)  |
| MalK ( <i>E. coli</i> )                        | Nukleotid frei<br>ATP                                                    | (Chen et al., 2003)       |
| MalK ( <i>T. litoralis</i> )                   | PP <sub>i</sub>                                                          | (Diederichs et al., 2000) |
| MJ0796 ( <i>M. jannaschii</i> )                | ADP/Mg <sup>2+</sup>                                                     | (Yuan et al., 2001)       |
| MJ0796 E171Q ( <i>M. jannaschii</i> )          | ATP/Na <sup>+</sup>                                                      | (Smith et al., 2002)      |
| MJ1267 ( <i>M. jannaschii</i> )                | Nukleotid frei, ADP/Mg <sup>2+</sup>                                     | (Karpowich et al., 2001)  |
| TAP1 ( <i>H. sapiens</i> )                     | ADP/Mg <sup>2+</sup>                                                     | (Gaudet und Wiley, 2001)  |

Tab. 1.2: Ausgewählte Kristallstrukturen von ABC-Transportern bzw. ihren isolierten NBDs. Gezeigt sind ABC-Transporter bzw. isolierte NBDs bekannter dreidimensionaler Struktur unter Angabe des funktionalen Zustands, des Organismus aus dem sie stammen sowie eventuell eingeführter Mutationen.

Die Strukturen der NBDs – isoliert oder im Kontext des vollständigen Transporters – zeigen für ihre Monomere eine sehr ähnliche Grundstruktur, die eine L-Form besitzt und in zwei

Subdomänen unterteilt werden kann. Die Subdomäne I, die katalytische Domäne, besitzt eine  $\alpha/\beta$  Struktur und enthält in ihrem „F<sub>1</sub>-core“ (Abrahams et al., 1994) ein typisches Phosphatbindungsmotiv, das vom Walker A und B Motiv gebildet wird (Walker et al., 1982). Weiterhin enthält die Subdomäne I mit der H- und der D-Schleife weitere charakteristische Sequenzmotive von ABC-Transportern. Die Subdomäne II, die helikale Domäne, besteht vollständig aus  $\alpha$ -Helices und enthält die C-Schleife, die auch als ABC Signaturmotiv bezeichnet wird, sowie die „structurally diverse region“ (Schmitt et al., 2003), die an der Interaktion mit den TMDs beteiligt zu sein scheint. Die beiden Subdomänen werden von zwei Segmenten der Polypeptidkette, die nach wichtigen Resten in ihnen als Q- bzw. Pro-Schleife bezeichnet werden, verbunden. Einen Überblick über die beschriebenen konservierten Motive gibt *Abb. 1.2* anhand der Struktur der isolierten NBD des ABC-Transporters HlyB.



*Abb. 1.2:* Die Struktur von NBDs. Beispielhaft ist die monomere Struktur der isolierten NBD des ABC-Transporters HlyB (Proteindatenbank Zugangscode 1MT0) gezeigt. Die katalytische bzw. die helikale Subdomäne des Proteins sind in hellgelb und hellgrau bzw. hellbraun dargestellt. Die konservierten Sequenzmotive von ABC-Transportern sind farblich hervorgehoben (modifiziert nach (Zaitseva et al., 2005b)).

Die strukturelle Untersuchung isolierter NBDs hat gezeigt, dass die ATP Bindung in der katalytischen Domäne eine „rigid body motion“ der helikalen Domäne von etwa 20° relativ zur katalytischen Domäne induziert und auf diese Weise eine Dimerisierung der ansonsten monomeren NBDs ermöglicht (Chen et al., 2003; Karpowich et al., 2001; Smith et al., 2002; Zaitseva et al., 2005a). Die Architektur dieses „composite dimer“ ist, obwohl anfangs kontrovers diskutiert, mittlerweile durch biochemische und strukturelle Daten abgesichert (Chen et al., 2003; Chen et al., 2001; Karpowich et al., 2001; Smith et al., 2002; Zaitseva et al., 2005a; Zaitseva et al., 2005c) und in *Abb. 1.3* anhand der Struktur der NBD des ABC-Transporters HlyB im Komplex mit ATP/Mg<sup>2+</sup> dargestellt.

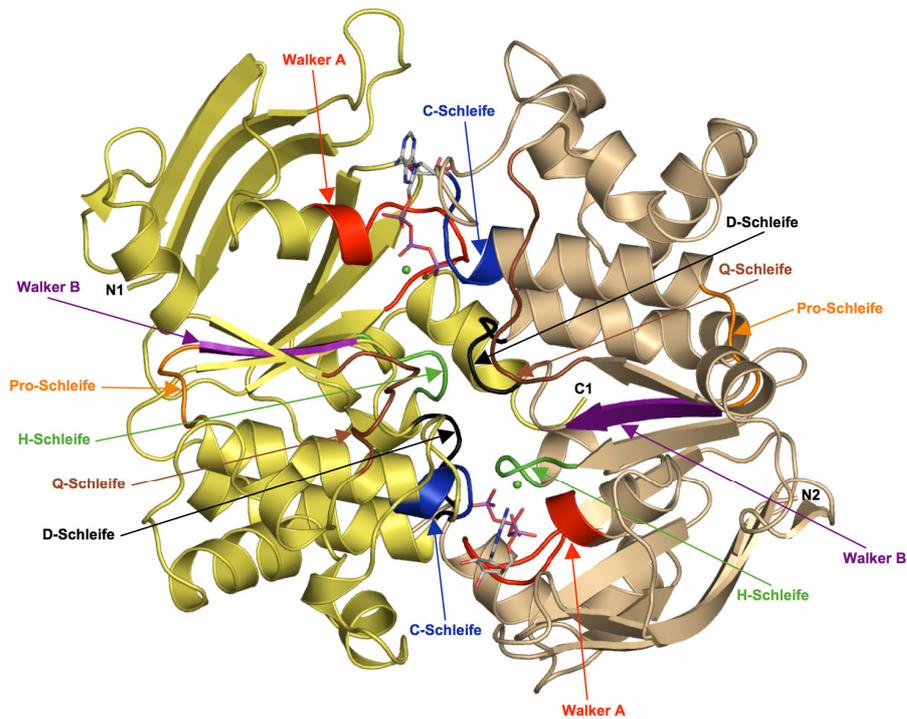


Abb. 1.3: Die Struktur des „composite dimer“. Dargestellt ist die isolierte NBD des ABC-Transporters HlyB im ATP/Mg<sup>2+</sup> gebundenen Zustand (Proteindatenbank Zugangscode 1XEF). Die beiden Monomere sind in hellgelb und hellbraun dargestellt. Weiterhin sind die konservierten Sequenzmotive von ABC-Transportern farblich hervorgehoben (modifiziert nach (Zaitseva et al., 2005a)).

Die Strukturen der „composite dimer“ zeigen, dass das gebundene ATP als eine Art „molekularer Klebstoff“ wirkt, indem es vom Walker A Motiv des einen Monomers – dem cis Monomer – und der C-Schleife des anderen Monomers – dem trans Monomer – koordiniert wird (Chen et al., 2003; Smith et al., 2002; Zaitseva et al., 2005a). Im Fall der NBD von HlyB trägt das ATP mit 450 Å<sup>2</sup> etwa ein Viertel zur gesamten Interaktionsfläche (engl. „buried surface area“) der beiden Monomere bei (Zaitseva et al., 2005a). Weiterhin zeigen die Strukturen eine Interaktion der D-Schleife eines Monomers mit dem Walker A Motiv des anderen Monomers, was für die Kommunikation der beiden NBDs von Bedeutung sein könnte.

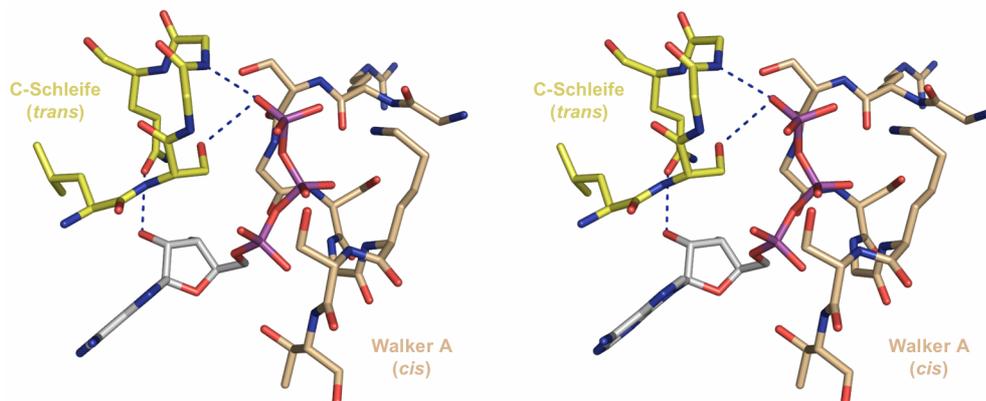


Abb. 1.4: Stereoabbildung der Interaktionen der C-Schleife mit dem gebundenen ATP im „composite dimer“ der isolierten NBD von HlyB (modifiziert nach (Hanekop et al., 2006)).

Die Analyse der Wechselwirkung der C-Schleife mit dem gebundenen ATP in der isolierten NBD von HlyB liefert eine mögliche Erklärung für die Stabilität des „composite dimer“ in Gegenwart von ATP, nicht aber von ADP, denn mit einer Ausnahme sind alle Interaktionen der C-Schleife auf das  $\gamma$ -Phosphat des Nukleotids gerichtet (Hanekop et al., 2006), was in



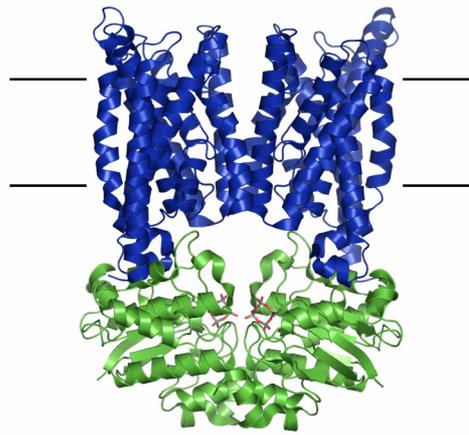


Abb. 1.6: Die Kristallstruktur des ABC-Transporters BtuCD. Dargestellt ist die Struktur des BtuCD Komplexes (Proteindatenbank Zugangscode IL7V) bestehend aus zwei NBDs (BtuD, in grün) und zwei TMDs (BtuC, in blau). Das von den NBDs gebundene Cyclotetranadat ist als „stick“ Modell dargestellt. Die Grenzen der Lipiddoppelschicht sind durch Linien angedeutet.

Die beiden NBDs des Transporters zeigen, obwohl als Ligand lediglich ein Cyclotetranadat gebunden ist, eine dem für isolierte NBDs mit gebundenem ATP beschriebenen „composite dimer“ ähnliche Anordnung. Die beiden Monomere besitzen dabei mit einer Interaktionsfläche von  $740 \text{ \AA}^2$  lediglich zwei Fünftel des für die isolierte NBD von HlyB beschriebenen Wertes (Zaitseva et al., 2005a). Die Positionen von zwei der vier in der Struktur gebundenen Vanadate lassen sich mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Positionen der Nukleotide in Strukturen anderer NBDs überlagern. Die beiden TMDs des Komplexes bestehen aus jeweils zehn membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices und bilden einen großen wassergefüllten Kanal, der zum Periplasma hin geöffnet ist und an seinem cytoplasmatischen Ende durch die Schleife zwischen den Transmembranhelices 4 und 5 verschlossen wird. Der beschriebene Kanal könnte nach Meinung der Autoren den Weg für die Translokation des Substrats bilden. Die Analyse der Interaktionen zwischen den NBDs und den TMDs zeigt, dass diese eine Interaktionsfläche von  $\sim 1500 \text{ \AA}^2$  besitzen. Im integralen Membranprotein BtuC ist an dieser Wechselwirkung hauptsächlich die Schleife zwischen den Transmembranhelices 6 und 7 beteiligt. Diese wird von zwei kurzen Helices gebildet, die durch einen scharfen Knick verbunden sind und die auf Grund ihrer Form von den Autoren als L-Schleife bezeichnet wird. Die Autoren vermuten auf Grund der Sequenzhomologie der L-Schleife zu funktional bedeutenden Abschnitten in anderen ABC-Transportern, dass es sich bei dieser um eine generelle Schnittstelle zwischen den TMDs und NBDs von ABC-Transportern handelt. Auf Seiten der NBD (BtuD) dominieren Reste in und um die hochkonservierte Q-Schleife die Interaktion mit den TMDs (BtuC), was nach Meinung der Autoren für eine Kopplung der für die ATP Bindung und Hydrolyse wichtigen Motive an die Konformation der L-Schleife spricht.

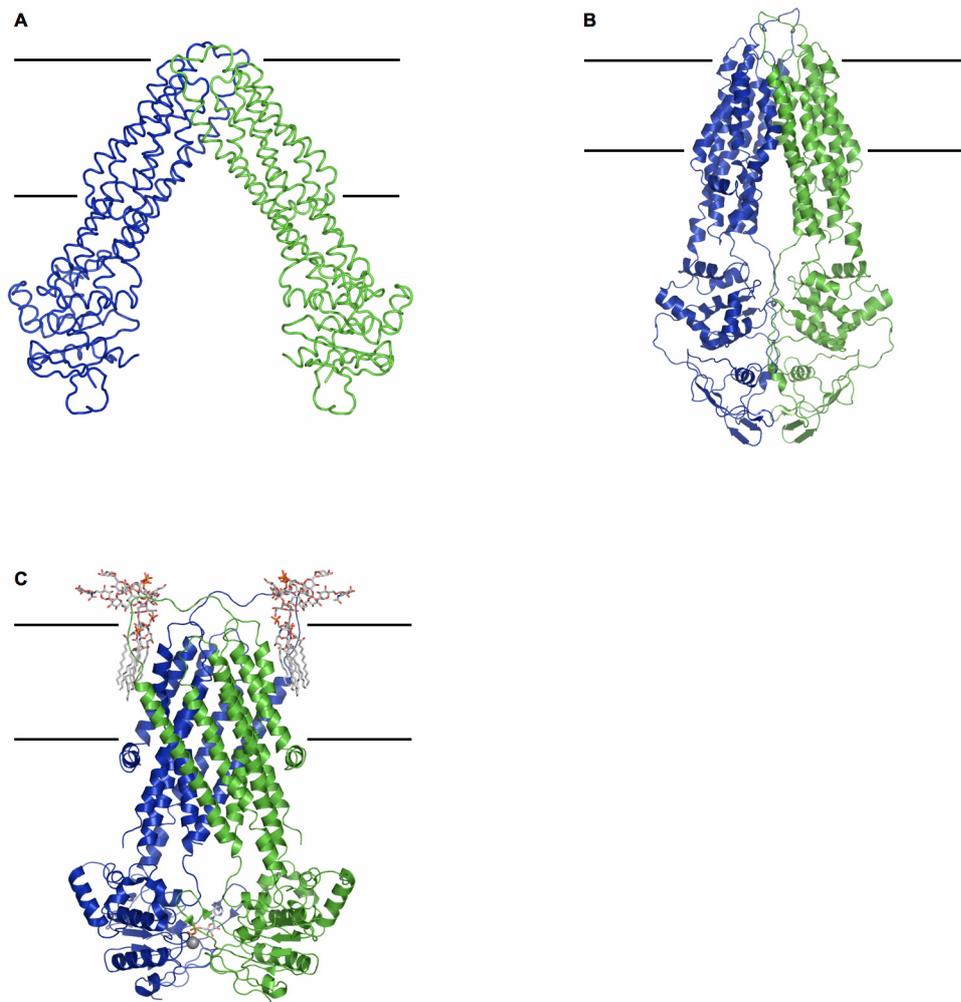


Abb. 1.7: Die Kristallstrukturen des ABC-Transporters MsbA. Gezeigt sind (A) der Verlauf der  $C_{\alpha}$ -Atome von MsbA aus *E. coli* (Proteindatenbank Zugangscode 1JSQ) sowie die Strukturen von MsbA aus (B) *V. cholera* (Proteindatenbank Zugangscode 1PF4) und (C) *S. typhimurium* (Proteindatenbank Zugangscode 1Z2R). Die beiden Monomere der MsbA Dimere sind grün und blau eingefärbt. Die in (C) gebundenen Substrate  $ADP \cdot V_i$  sowie die beiden Lipopolysaccharide sind mit Ausnahme des Vanadat in Form von „stick“ Modellen dargestellt. Die Grenzen der Lipiddoppelschicht sind durch Linien angedeutet.

Die Strukturen des ABC-Transporters MsbA aus *E. coli* (Chang und Roth, 2001), *V. cholera* (Chang, 2003) und *S. typhimurium* (Reyes und Chang, 2005), die in Abb. 1.7 dargestellt sind, zeigen einen Dimer aus zwei so genannten „half-size“ Transportern, bei denen jeweils eine TMD und eine NBD fusioniert sind. Die TMDs von MsbA bestehen in den vorliegenden Strukturen aus jeweils sechs  $\alpha$ -Helices. Weiterhin zeigen die drei Kristallstrukturen von MsbA übereinstimmend eine dritte Domäne neben der NBD und der TMD, die von den Autoren als „intracellular domain“ (ICD) bezeichnet wird und die zwischen den beiden anderen Domänen lokalisiert ist. Die Substrat freien MsbA Strukturen aus *E. coli* und *V. cholera* sowie die Struktur aus *S. typhimurium*, die ein gebundenes  $ADP \cdot V_i$  und zwei Lipopolysaccharide (Ra LPS) enthält, zeigen eine grundverschiedene Organisation des Proteins. In der von den Autoren als „open apo“ Konformation bezeichneten MsbA Struktur aus *E. coli* interagieren die beiden TMDs an den extrazellulären Enden ihrer membrandurchspannenden Helices miteinander, wodurch eine umgekehrt V-förmige Struktur entsteht. In dieser Struktur sind die nur teilweise in der Elektronendichte sichtbaren NBDs räumlich weit voneinander entfernt. Im Gegensatz dazu bilden die NBDs bzw. die TMDs in der als „closed apo“

Konformation bezeichneten MsbA Struktur aus *V. cholera* intermolekulare Kontakte miteinander aus und stabilisieren auf diese Weise den Dimer. Die NBDs bzw. die TMDs tragen dabei eine Interaktionsfläche von  $\sim 1650 \text{ \AA}^2$  bzw.  $\sim 1500 \text{ \AA}^2$  zur Wechselwirkung der beiden „half size“ Transporter bei. Die beiden TMDs von MsbA aus *V. cholera* bilden eine große vom Zytoplasma zugängliche interne Kammer. Die in der MsbA Struktur aus *E. coli* teilweise nicht geordneten NBDs sind in der Struktur aus *V. cholera* vollständig aufgelöst, zeigen jedoch nicht die auf Grundlage der Untersuchung isolierter NBDs erwartete Struktur.

In der Substrat gebundenen MsbA Struktur aus *S. typhimurium* (Reyes und Chang, 2005), die ein gebundenes  $\text{ADP}\cdot\text{V}_i$  und zwei Lipopolysaccharide (Ra LPS) enthält, sind die Letzteren in der dem äußeren Blatt der Membran entsprechenden Seite der TMDs von MsbA gebunden. Die Lipopolysaccharide bilden dabei umfassende Kontakte mit den Transmembranhelices 1 und 6 des einen Monomers sowie der Transmembranhelix 2 des anderen Monomers aus. Die beiden TMDs bilden in der MsbA Struktur aus *S. typhimurium* eine interne Kammer, die jedoch im Unterschied zur „closed apo“ Konformation ausschließlich vom Periplasma aus zugänglich ist. Die beiden NBDs von MsbA aus *S. typhimurium* zeigen eine an den „composite dimer“ erinnernde Anordnung. In dieser ist lediglich in einer der beiden aktiven Zentren ein Nukleotid ( $\text{ADP}\cdot\text{V}_i$ ) gebunden und das ABC Signaturmotiv des gegenüberliegenden Monomers ist nicht mehr in Kontakt mit der P-Schleife und dem gebundenen Nukleotid. Diese Anordnung der NBDs stellt nach Meinung der Autoren eine Post-Hydrolyse Konformation dar, in welcher eines der gebundenen Nukleotide den Komplex bereits verlassen hat. Die Wechselwirkung der NBDs und TMDs von MsbA aus *S. typhimurium* erfolgt durch eine der L-Schleife von BtuCD äquivalente Helix der ICD 1, die mit der Q-Schleife der NBD interagiert.

In Bezug auf die beiden MsbA Strukturen aus *E. coli* und *V. cholera* ist jedoch anzumerken, dass diese unter anderem auf Grund der Orientierung der NBDs relativ zu den TMDs sowie der Struktur der NBDs kritisch diskutiert worden sind (Davidson und Chen, 2004; Jones und George, 2004; van der Does und Tampe, 2004).

#### 1.1.4 Substratbindeproteine

ABC-Transporter können, wie eingangs beschrieben, auf Grund ihrer Transportrichtung in Importer und Exporter unterschieden werden. Die ausschließlich in Prokaryonten vorkommenden Importer benötigen dabei, im Unterschied zu den Exportern, in der Regel fünf Domänen bzw. Untereinheiten für ihre Transportfunktion. Diese Domänen umfassen neben den bei allen ABC-Transportern vorhandenen NBDs und TMDs auch Substratbindeproteine (Higgins et al., 1982), die für jeden ABC-Transporter spezifisch sind. Die Aufgabe der Substratbindeproteine im Kontext des gesamten Transporters ist es, die extrazellulären Substrate zu binden und an die in der Membran lokalisierte Transportmaschinerie weiterzugeben, wodurch sie wesentlich für die Substratspezifität des Systems verantwortlich sind (Boos und Lucht, 1996).

In gram-negativen Bakterien liegen die Substratbindeproteine von ABC-Transportern in löslicher Form im Periplasma vor. Im Unterschied dazu sind die Substratbindeproteine in gram-positiven Bakterien und Archaea normalerweise durch eine an den Amino-terminus des Proteins angehängte Lipidgruppe in der Membran verankert (Gilson et al., 1988). In einigen Fällen, wie dem OpuABC Protein des OpuA Systems aus *L. lactis*, ist das Substratbindeprotein jedoch auch mit dem integralen Membranprotein des ABC-Transporters fusioniert (van der Heide und Poolman, 2000).

Weiterhin besitzt eine Untergruppe der Substratbindeproteine neben ihrer Aufgabe beim Substrattransport eine zweite Funktion als Rezeptor für chemotaktische Signale (Wilkinson und Verschueren, 2003). Beispiele hierfür sind die für Ribose, Maltose und Galaktose/Glucose spezifischen Substratbindeproteine.

### 1.1.5 Struktur der Substratbindeproteine

Die Substratbindeproteine besitzen trotz ihrer geringen Sequenzhomologie und der Diversität der von ihnen gebundenen Substrate die gleiche zugrunde liegende Faltung, eine Bindeproteinfaltung. Diese Bindeproteinfaltung zeichnet sich durch den Aufbau aus zwei globulären Domänen ähnlicher Topologie aus, wobei jede Domäne aus einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt, das von  $\alpha$ -Helices flankiert wird, besteht.

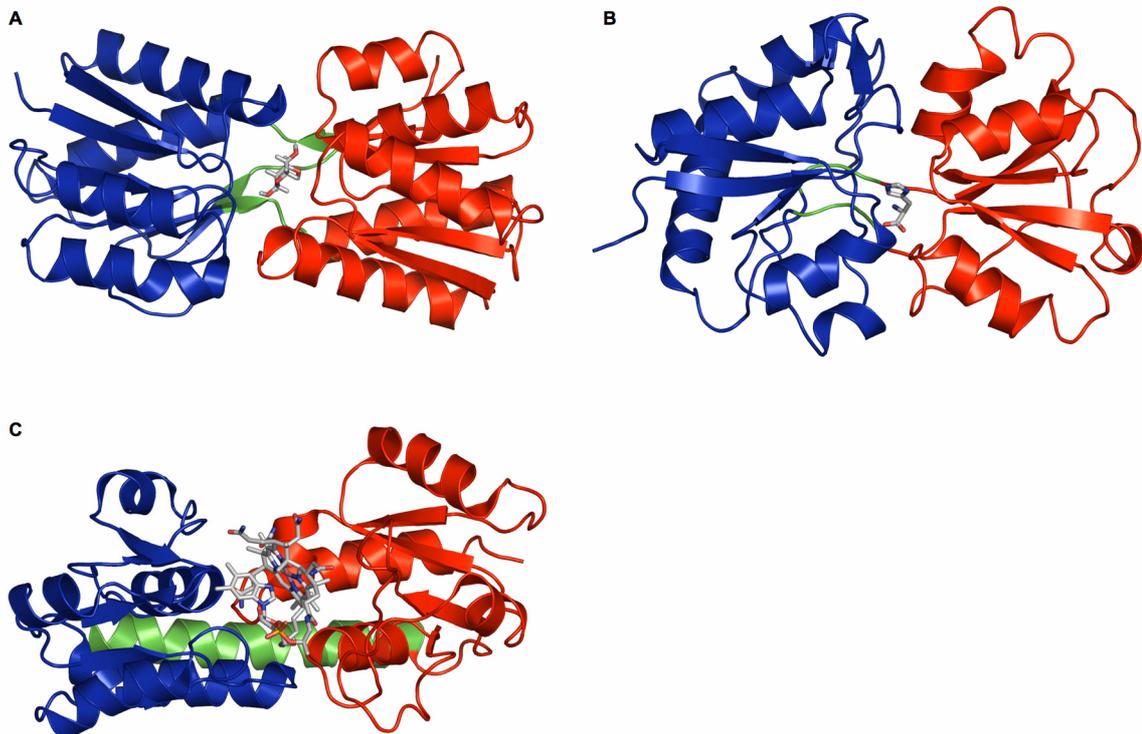


Abb. 1.8: Die Bindeproteinfaltung. Gezeigt sind beispielhaft für Gruppe I, die Gruppe II und die verbleibenden Substratbindeproteine die geschlossenen Substrat gebundenen Konformationen von (A) RbsB (Proteindatenbank Zugangscode 2DRI) aus *E. coli* im Komplex mit Ribose, (B) HisJ (Proteindatenbank Zugangscode 1HSL) aus *E. coli* im Komplex mit Histidin und (C) BtuF (Proteindatenbank Zugangscode 1N2Z) aus *E. coli* mit gebundenem Vitamin B<sub>12</sub>. Die Domänen 1 und 2 sowie die aus einem bis drei Segmenten der Polypeptidkette bestehende Gelenkregion sind in den Strukturen blau, rot und grün eingefärbt. Die gebundenen Substrate sind als „stick“ Modelle dargestellt.

Die beiden Domänen der Substratbindeproteine werden von einer Gelenkregion verbunden, die aus einem bis drei Segmenten der Polypeptidkette besteht (Wilkinson und Verschueren,

2003). Die Substratbindeproteine werden auf Grundlage ihrer Faltung in drei Gruppen eingeteilt, die sich in der Zahl der verbindenden Segmente in der Gelenkregion zwischen den beiden Domänen unterscheiden und deren Strukturen in *Abb. 1.8* anhand von Beispielen gezeigt sind. Die Substratbindeproteine der Gruppe I besitzen eine Gelenkregion, die von drei Segmenten der Polypeptidkette gebildet wird. Im Unterschied dazu verfügen die Vertreter der Gruppe II lediglich über zwei solcher verbindenden Segmente. Eine eigene Gruppe bilden Substratbindeproteine wie BtuF aus *E. coli* (Borths et al., 2002; Karpowich et al., 2003), PsaA aus *S. pneumoniae* (Lawrence et al., 1998) und FhuD aus *E. coli* (Clarke et al., 2000), die nur ein verbindendes Segment der Polypeptidkette in der Gelenkregion aufweisen.

Die Substratbindungsstelle der Bindeproteine ist, wie die Beispiele in *Abb. 1.8* veranschaulichen, in der Spalte zwischen den beiden Domänen lokalisiert, wobei die Substrate häufig vollständig vom Lösungsmittel abgeschirmt werden. Die Strukturbestimmung einer Reihe von Substratbindeproteinen ohne und mit gebundenem Substrat zeigt für diese Proteine eine normalerweise Substrat freie offene („open“) Konformation und eine in der Regel Substrat gebundene geschlossene („closed“) Konformation (Bjorkman und Mowbray, 1998; Hsiao et al., 1996; Sharff et al., 1992). Ihr Vergleich zeigt, dass es im Zuge der Substratbindung zu einer großen relativen Bewegung der beiden Domänen aufeinander zu kommt, während sich die Strukturen der beiden Domänen nicht signifikant verändern. Im Rahmen dieser Veränderung der relativen Orientierung der beiden Domänen zueinander wird das Substrat vom Protein eingeschlossen. Die Grundlage hierfür sind Veränderungen einiger Hauptketten-Torsionswinkel in der Gelenkregion, welche die beiden Domänen verbindet. Für den Mechanismus der Substratbindung, der mit einem Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation verbunden ist, wird angenommen, dass das Substrat anfänglich nur mit einer der beiden Domänen des Proteins in der offenen Konformation interagiert. Anschließend geht das Substratbindeprotein in die geschlossene Konformation über, wodurch das Substrat eingeschlossen wird, mit beiden Domänen interagiert und auf diese Weise die geschlossene Konformation stabilisiert (Mao et al., 1982; Wilkinson und Verschueren, 2003).

## 1.2 „multidrug resistance“

Die Selektion von kultivierten Krebszellen mit einem bestimmten zur Therapie von malignen Tumoren eingesetzten Medikament erlaubt die Identifizierung zweier Klassen resistenter Zellen. Einerseits werden Krebszellen gefunden, die gegen Pharmaka mit demselben Wirkungsmechanismus resistent sind. Andererseits können Krebszellen identifiziert werden, die eine Resistenz gegen eine Vielzahl chemisch sehr verschiedener Medikamente mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen zeigen (Endicott und Ling, 1989; Gottesman und Pastan, 1993). Das letztere Phänomen wird als „multidrug resistance“ bezeichnet und stellt ein großes Problem in der modernen Chemotherapie maligner Tumore dar.

An der Entstehung der „multidrug resistance“ scheinen eine Vielzahl von Faktoren beteiligt zu sein, wobei jedoch deutliche Hinweise auf eine entscheidende Rolle von energieabhängigen Transportsystemen bestehen. Diese Transportsysteme verhindern entweder das Eindrin-

gen der Chemotherapeutika in die Zelle oder transportieren diese aktiv wieder aus ihr heraus (Ambudkar et al., 1999; Gottesman und Pastan, 1993). Der auf diese Weise verminderte Einstrom und/oder der verstärkte Ausstrom der Chemotherapeutika aus der Zelle führt zu einer verringerten intrazellulären Akkumulation dieser Substanzen und damit zu einem Wirkverlust. Ein entscheidender Schritt hierfür ist die Überexpression bestimmter energieabhängiger Transportsysteme.

Der vom humanen *MDR1* Gen kodierte ABC-Transporter P-Glykoprotein (P-gp, ABCB1) war das erste ATP-abhängige Transportsystem dessen Überexpression in Zusammenhang mit der Entstehung der „multidrug resistance“ gebracht werden konnte (Juliano und Ling, 1976), weshalb es seitdem intensiv charakterisiert wurde (Ambudkar et al., 1999; Gottesman und Pastan, 1993; Senior et al., 1995a; Senior et al., 1995b). In den folgenden Jahren zeigte sich jedoch, dass die Überexpression des P-Glykoproteins nicht die einzige Grundlage der Entstehung einer „multidrug resistance“ war, denn es wurden Krebszellen gefunden, die keine erhöhte Expression des P-Glykoproteins zeigten, aber dennoch gegen ein breites Spektrum von Naturstoffen resistent waren. Die Analyse dieser Zelllinien offenbarte in einigen die gesteigerte Expression eines anderen Vertreters der ABC-Transporter Familie, der als „multidrug resistance associated protein 1“ (MRP1; ABCC1) bezeichnet wird (Cole et al., 1992). Weiterhin wurde in Krebszellen, die keine Überexpression von P-gp oder MRP1 zeigten, aber einen „multidrug resistance“ Phänotyp besaßen, die Überexpression eines anderen ABC-Transporters, des „breast cancer resistance protein“ (BCRP, ABCG2) nachgewiesen (Allikmets et al., 1998; Doyle et al., 1998).

### 1.2.1 Der MDR-ABC-Transporter P-Glykoprotein

Das humane P-Glykoprotein (P-gp, ABCB1) ist ein in der Plasmamembran lokalisiertes integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa, das häufig an der Entstehung einer „multidrug resistance“ beteiligt ist. Es ist ein Vertreter der ABC-Transporter Familie und besitzt einen für diese Proteinfamilie typischen Aufbau aus zwei hydrophoben TMDs und zwei hydrophilen NBDs, die im Fall des P-Glykoproteins in einer einzigen Polypeptidkette fusioniert sind. Hydropathie Analysen ergeben, dass die beiden TMDs von je sechs Transmembranhelices gebildet werden. Die beiden NBDs des Proteins zeigen alle für diese Domänen charakteristischen Sequenzmotive, wie ein Walker A und B Motiv sowie ein ABC Signaturmotiv. Die funktionale Untersuchung des P-Glykoproteins zeigt, dass dieses in der Lage ist, ein sehr breites Spektrum hydrophober Substanzen aktiv aus der Zelle heraus zu transportieren (Sharom, 1997), von denen ausgewählte in *Tab. 1.3* wiedergegeben sind. Die Substrate des P-Glykoproteins sind typischerweise hydrophobe Moleküle mit einem Molekulargewicht von 300 bis 2000 Da von denen einige eine positive Ladung bei pH 7 tragen (Ford und Hait, 1990; Germann, 1996; Sharom et al., 1999).

| Substrate                        | typische Vertreter                  |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Vinca Alkaloide                  | Vinblastin und Vincristin           |
| Anthracycline                    | Daunorubicin und Doxorubicin        |
| Epipodophyllotoxine              | Etoposid und Teniposid              |
| Antibiotika                      | Dactinomycin und Actinomycin D      |
| Sonstige zytotoxische Substanzen | Paclitaxel, Topotecan und Colchicin |
| Inhibitoren                      | typische Vertreter                  |
| Ca <sup>2+</sup> -Kanalblocker   | Verapamil und Dihydropyridine       |
| Antihypertensiva                 | Reserpin und Yohimbin               |
| Immunsuppressiva                 | Cyclosporin A und FK506             |
| Steroidhormone                   | Progesteron                         |
| HIV Proteaseinhibitoren          | Sequinavir und Indinavir            |

Tab. 1.3: Substrate und Inhibitoren des P-Glykoproteins. Gezeigt sind ausgewählte Klassen von Substraten und Inhibitoren des P-Glykoproteins sowie einige typische Vertreter (entnommen aus (Sauna et al., 2001)).

Für den Transportmechanismus des P-Glykoproteins sind im Wesentlichen drei verschiedene Modelle vorgeschlagen worden, die in *Abb. 1.9* schematisch dargestellt sind.

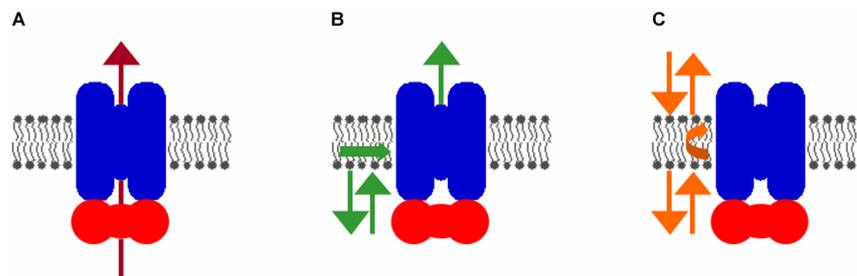


Abb. 1.9: Modelle für den Transportmechanismus des P-Glykoproteins. Schematisch dargestellt sind (A) das „aqueous pore“, (B) das „hydrophobic vacuum cleaner“ und (C) das „flippase“ Modell (Erläuterungen siehe Text).

Im Rahmen des „aqueous pore“ Modells (Altenberg et al., 1994) wird angenommen, dass das P-Glykoprotein seine Substrate direkt aus dem Zytoplasma in das extrazelluläre Medium transportiert. Im Gegensatz dazu nimmt das „hydrophobic vacuum cleaner“ Modell (Raviv et al., 1990) an, dass das P-Glykoprotein seine Substrate aus dem inneren Blatt der Membran in das extrazelluläre Medium transportiert. In einer Abwandlung des „hydrophobic vacuum cleaner“ Modells, dem „flippase“ Modell (Higgins und Gottesman, 1992), wird angenommen, dass das P-Glykoprotein seine Substrate vom inneren Blatt der Membran in das äußere Blatt der Membran transportiert, von welchem sie in das extrazelluläre Medium diffundieren. Eine Entscheidung, welches der geschilderten Modell zutreffend ist, kann auf Grund der derzeitigen Datenlage nicht zweifelsfrei getroffen werden, jedoch lassen die hydrophoben Eigenschaften der meisten Substrate des P-Glykoproteins sowie zahlreiche Untersuchungen, *in vivo* und *in vitro*, die beiden letztgenannten Modell wahrscheinlicher erscheinen (Homolya et al., 1993; Romsicki und Sharom, 2001; Shapiro und Ling, 1997; Shapiro und Ling, 1998; van Helvoort et al., 1996). Neben einer Fülle an biochemischen Daten wurden für das P-Glykoprotein auch strukturelle Informationen mittels Elektronenmikroskopie gewonnen (Rosenberg et al., 1997; Rosenberg et al., 2005; Rosenberg et al., 2003; Rosenberg et al., 2001). Die im Rahmen dieser Studien erhaltenen Strukturen des P-Glykoproteins in der Nukleotid freien und der AMP-PNP gebundenen Form mit einer Auflösung von  $\sim 20 \text{ \AA}$  zeig-

ten eine signifikante Reorganisation der gesamten TMDs des Proteins im Zuge der Nukleotidbindung (Rosenberg et al., 2003). Weiterhin ergab die Bestimmung der Struktur des P-Glykoproteins in seiner AMP-PNP gebundenen Form mit einer Auflösung von  $\sim 8 \text{ \AA}$  eine pseudo 2-zählige Symmetrie für fünf der sechs  $\alpha$ -Helices seiner beiden TMDs (Rosenberg et al., 2005). Insgesamt lassen die bisher für das P-Glykoprotein gewonnenen strukturellen Informationen jedoch keine Rückschlüsse auf seinen molekularen Mechanismus zu.

### 1.2.2 Der MDR-ABC-Transporter LmrA

Der aus dem gram-positiven Milchsäurebakterium *L. lactis* stammende ABC-Transporter LmrA war der erste beschriebene Vertreter dieser Familie von aktiven Transportern in einem Prokaryoten, der in der Lage ist, durch seine Überexpression einen „multidrug resistance“ Phänotyp zu vermitteln (Bolhuis et al., 1994; Bolhuis et al., 1996; van Veen et al., 1996). Die Bedeutung von LmrA für die Entwicklung eines „multidrug resistance“ Phänotyps in *L. lactis* ist jedoch nach der Charakterisierung des MDR-ABC-Transporter LmrCD (Lubelski et al., 2004) wieder in Frage gestellt worden (van den Berg van Saparoea et al., 2005), weshalb zur Klärung dieser Frage weitere Experimente notwendig zu sein scheinen.

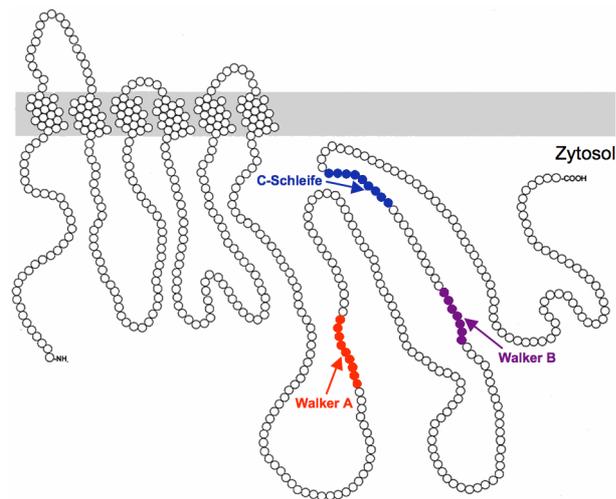


Abb. 1.10: Topologiemodell von LmrA. Die Abbildung zeigt ein Topologiemodell der amino-terminalen TMD und der carboxy-terminalen NBD. Die konservierten Sequenzmotive des Proteins sind farblich hervorgehoben (modifiziert nach (Putman et al., 2000)).

Der ABC-Transporter LmrA besteht, wie das Topologiemodell in Abb. 1.10 veranschaulicht, aus einer amino-terminalen TMD und einer carboxy-terminalen NBD. Die NBD von LmrA enthält alle für diese Domänen charakteristischen Sequenzmotive, wie ein Walker A und B Motiv sowie eine C-Schleife. Hydropathie Analysen des Proteins legen nahe, dass seine TMD von sechs Transmembranhelices gebildet wird (van Veen et al., 1996). Die funktionale Charakterisierung des Proteins zeigt, dass seine funktionale Einheit ein aus zwei Monomeren bestehender Homodimer ist (van Veen et al., 2000). In Bezug auf den Transportmechanismus sind für LmrA analog zum P-Glykoprotein das „aqueous pore“ Modell sowie das „hydrophobic vacuum cleaner“ und „flippase“ Modell diskutiert worden, die in Abb. 1.9 schematisch dargestellt sind. Für LmrA werden, wie für das P-Glykoprotein, auf Grund

unterschiedlicher Experimente (Bolhuis et al., 1996) die beiden letztgenannten Modelle favorisiert.

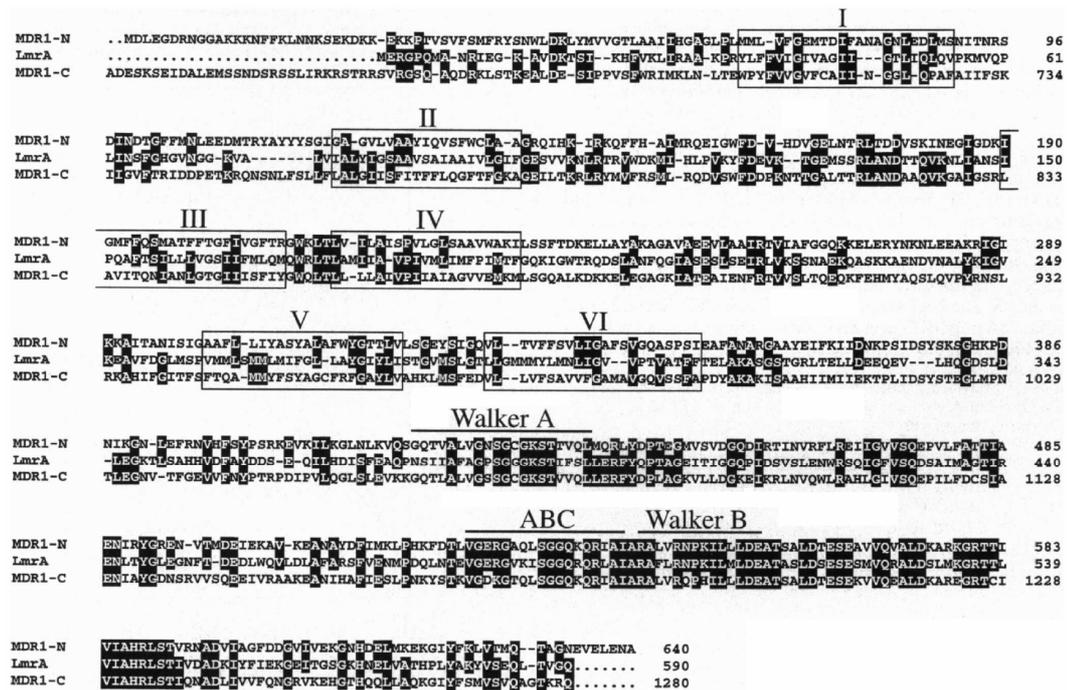


Abb. 1.11: Sequenzvergleich von LmrA mit der amino- bzw. carboxy-terminalen Hälfte des humanen P-Glykoproteins. Die identischen Aminosäurereste sind schwarz unterlegt. Die putativen Transmembranhelices von LmrA sind mit römischen Zahlen benannt. Weiterhin sind die Walker A und B Motive sowie das ABC Signaturmotiv gekennzeichnet (entnommen aus (van Veen et al., 1996)).

Ein Sequenzvergleich von LmrA mit anderen Mitgliedern der ABC-Transporter Familie verdeutlicht seine signifikante Sequenzhomologie mit dem humanen P-Glykoprotein. LmrA und die beiden Hälften des humanen P-Glykoproteins besitzen, wie Abb. 1.11 zeigt, 34 % identische Reste sowie weitere 16 % an konservativen Substitutionen (van Veen et al., 1996). Von weitaus größerer Bedeutung ist jedoch die funktionale Austauschbarkeit von LmrA und dem humanen P-Glykoprotein, die sich bei ihrer Untersuchung in menschlichen Lungenfibroblasten und Insektenzellen ergab (van Veen et al., 1998). Die Grundlage hierfür bildet erstens die durch die Expression von LmrA in menschlichen Lungenfibroblasten entstehende Resistenz gegen eine Vielzahl von Naturstoffen und synthetischen Chemotherapeutika, die typische Substrate des P-Glykoproteins darstellen. Zweitens kann der auf diese Weise erhaltene „multidrug resistance“ Phänotyp der LmrA exprimierenden Lungenfibroblasten durch Inhibitoren des P-Glykoproteins vollständig umgekehrt werden, was zusammenfassend die ähnliche Substrat- und Inhibitorenspezifität von LmrA und dem humanen P-Glykoprotein zeigt. Drittens ergibt die funktionale Untersuchung von LmrA und dem humanen P-Glykoprotein in Insektenzellen nahezu identische Affinitäten für die Substrate Vinblastin und ATP. Viertens zeigt die Analyse der pharmakologischen Interaktionen zwischen Substraten und Inhibitoren zwei allosterisch gekoppelte Substratbindungsstellen von LmrA, die nicht von denen des P-Glykoproteins unterscheidbar sind.

Mit Blick auf eine strukturelle Charakterisierung macht besonders die beschriebene funktionale Austauschbarkeit von LmrA und dem humanen P-Glykoprotein, die in Verbindung mit der Sequenzhomologie die funktionale und strukturelle Ähnlichkeit der beiden Proteine zeigt,

den bakteriellen MDR-ABC-Transporter LmrA zu einem optimalen Modellsystem zur strukturellen Untersuchung dieser medizinisch relevanten Klasse von aktiven Transportern. Die Verwendung des bakteriellen MDR-ABC-Transporters LmrA bietet gegenüber humanen Proteinen, wie dem P-Glykoprotein, einige entscheidende Vorteile. Einerseits erlaubt die homologe Expression von LmrA in *L. lactis* die Bereitstellung der für strukturelle Untersuchungen benötigten Proteinmengen. Andererseits besitzen bakterielle Proteine nicht die bei ihren eukaryontischen Gegenstücken in der Regel vorhandene Heterogenität durch Modifikationen, wie etwa Glykosylierung oder Phosphorylierung, die eine Kristallbildung stören könnten.

### **1.2.3 Röntgenstrukturanalyse von Membranproteinen – eine besondere Herausforderung**

Die Herausforderung der Röntgenstrukturanalyse von integralen Membranproteinen, wie dem MDR-ABC-Transporter LmrA, zeigt eine Analyse der Proteinstrukturdatenbank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). In dieser finden sich Anfang März 2006 rund 30000 Proteinstrukturen, die durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurden. Die  $\alpha$ -helikalen Membranproteine stellen jedoch mit rund 60 Kristallstrukturen von 26 unterschiedlichen Membranproteinen ([www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html](http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html)) lediglich einen verschwindend geringen Anteil an der Gesamtzahl der Proteinstrukturen. Die Ursache hierfür ist nicht ihre geringe Zahl, denn auf Basis der genomischen Sequenzdaten wird ihr Anteil an der Gesamtzahl der in den Genomen kodierten Proteine auf 20 bis 30 % geschätzt (Krogh et al., 2001; Wallin und von Heijne, 1998). Diese Fakten verdeutlichen zusammenfassend die Schwierigkeiten der Kristallisation von Membranproteinen, aber auch ihre Notwendigkeit für das Verständnis der Struktur und Funktion dieser wichtigen Klasse von Proteinen.

## **1.3 Osmoadaptation von Mikroorganismen**

In ihren natürlichen Lebensräumen sind die meisten Mikroorganismen häufig einer Veränderung ihrer Umweltbedingungen ausgesetzt. Beispielweise führt eine Veränderung der Osmolalität der Umgebung zu einem osmotischen Gradienten zwischen dem Zellinneren und ihrer Umgebung, was auf Grund der Permeabilität der Plasmamembran für Wasser einen Wasserfluss entlang des osmotischen Gradienten zur Folge hat. Im Fall eines Ansteigens der Osmolalität in ihrer Umgebung kommt es dabei zu einem Ausstrom von Wasser aus der Zelle, was zu einer Abnahme des Zellurgors bis hin zur Plasmolyse der Zelle führen kann. Im Unterschied dazu führt eine Abnahme der Osmolalität in der Umgebung durch den Einstrom von Wasser in die Zelle zum Ansteigen des Zellurgors und im Extremfall zum Bersten der Zelle (Kempf und Bremer, 1998). Neben der Abwendung der beschriebenen lebensbedrohlichen Zustände ist es für Mikroorganismen zur Sicherstellung ihrer normalen zellulären Physiologie wichtig, den Zellurgor in bestimmten Grenzen zu kontrollieren. Aus diesem Grund reagieren Mikroorganismen aktiv auf die Veränderung der Osmolalität in ihrer Umgebung, was im Allgemeinen als Osmoadaptation bezeichnet wird (Csonka und Epstein, 1996). Auf die Zunahme der Osmolalität in ihrer Umgebung und die damit verbundene Abnahme des Zellurgors rea-

gieren viele Mikroorganismen mit der Akkumulation bestimmter osmotisch aktiver, organischer Substanzen im Zytoplasma, was es ihnen ermöglicht, einen mit einer normalen Funktion der Zelle zu vereinbarenden Zellturgor wiederherzustellen. Die dabei angehäuften osmotisch aktiven, organischen Substanzen, die so genannten kompatiblen Solute, können durch *de novo* Synthese oder die Aufnahme aus der Umgebung akkumuliert werden (Csonka und Epstein, 1996). Das Spektrum der von Mikroorganismen als kompatible Solute verwendeten Moleküle beschränkt sich auf wenige Substanzklassen. Diese sind Zucker (z.B. Trehalose), Polyole (z.B. Glycerin), Aminosäuren (z.B. Prolin und Glutamat), Derivate von Aminosäuren (z.B. Ectoin und Prolin-Betain), quartäre Amine und ihre Sulfonium Analoga (z.B. Glycin-Betain), Sulfatester (z.B. Cholin-O-sulfat), N-acetylierte Diaminosäuren und kleine Peptide, wobei eine gemeinsame Eigenschaft aller dieser Substanzen ihre hohe Löslichkeit und das Fehlen einer Netto-Ladung bei physiologischem pH-Wert ist (Kempf und Bremer, 1998).

### 1.3.1 Osmoadaptation in *S. meliloti*

Der Vergleich der Osmoadaptation von *S. meliloti* mit den gut untersuchten Modellsystemen *E. coli* (Kempf und Bremer, 1998; Lucht und Bremer, 1994) und *B. subtilis* (Kempf und Bremer, 1998) zeigt einige interessante Besonderheiten dieses Bakteriums. Diese beziehen sich in erster Linie auf das Schicksal der von *S. meliloti* aufgenommenen kompatiblen Solute. Die kompatiblen Solute können in *S. meliloti* in zwei Klassen eingeteilt werden. Erstens die auch in vielen anderen Bakterien gefundenen, akkumulierten kompatiblen Solute und zweitens die nicht akkumulierten kompatiblen Solute, die bisher nur in diesem Bakterium beschrieben wurden und im Unterschied zu den erstgenannten nicht metabolisch inert sind (Gouffi und Blanco, 2000).

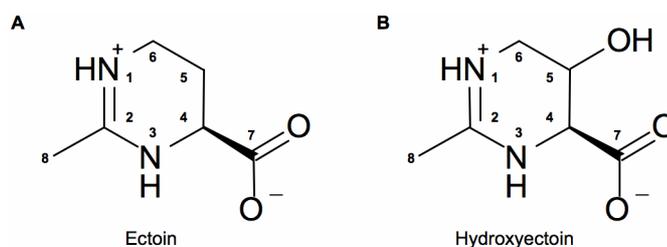


Abb. 1.12: Die Strukturen der kompatiblen Solute (A) Ectoin und (B) Hydroxyectoin.

Ein Beispiel der Klasse von nicht akkumulierten kompatiblen Soluten sind die in Abb. 1.12 gezeigten Aminosäurederivate Ectoin und Hydroxyectoin. Diese werden von *S. meliloti* im Wesentlichen mit Hilfe des zur Familie der ABC-Transporter gehörenden Ehu-Systems aufgenommen, das für die Osmoadaptation des Bakteriums in Gegenwart von Ectoin entscheidend ist (Jebbar et al., 2005).

### 1.3.2 Der ABC-Transporter Ehu und seine Komponenten

Das in *S. meliloti* für die Aufnahme der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin verantwortliche Ehu-System besteht aus den Proteinen EhuA, EhuB, EhuC, und EhuD, die eine NBD, ein Substratbindeprotein sowie zwei verschiedene integrale Membranproteine eines ABC-Transporters darstellen (Jebbar et al., 2005). Das Substratbindeprotein EhuB hat im

Kontext des Transporters die Aufgabe, die extrazellulären Substrate zu binden und an die in der Membran lokalisierte Transportmaschinerie weiterzugeben, wodurch es wesentlich für die Substratspezifität des Systems verantwortlich ist (Boos und Lucht, 1996). Die strukturelle Untersuchung des Substratbindeproteins EhuB im Komplex mit seinen Substraten eröffnet somit die Möglichkeit die molekularen Grundlagen für die Bindung der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin aufzuklären.

## 1.4 Motivation und Zielsetzung

ABC-Transporter sind eine faszinierende Klasse von Proteinen. Sie sind in der Lage unter Verwendung einer konservierten Motordomäne, der NBD, eine große Vielfalt an wichtigen zellulären Funktionen zu erfüllen. Sie sind dabei sowohl am Export von Molekülen aus der Zelle als auch an ihrer Aufnahme aus dem extrazellulären Milieu beteiligt. ABC-Transporter sind jedoch nicht nur aktive Transporter sondern einige dieser integralen Membranproteine stellen auch Liganden-gesteuerte Ionenkanäle oder regulatorische Untereinheiten von Ionenkanälen dar. Für das molekulare Verständnis der Funktion dieser bedeutenden Klasse von Membranproteinen ist die Aufklärung ihrer Struktur essentiell. So ist beispielweise ein tiefgreifendes Verständnis der Substratspezifität der ABC-Transporter nur schwer ohne die Strukturbestimmung der hierfür verantwortlichen Komponenten vorstellbar. In Bezug auf die ihre Substratspezifität bestimmenden Domänen oder Untereinheiten unterscheiden sich die ABC-Transporter mit einer Import- und einer Exportfunktion grundlegend. In ersteren wird die Substratspezifität wesentlich von ihren Substratbindeproteinen bestimmt. Im Unterschied dazu sind die für die Substratspezifität von ABC-Transportern mit einer Exportfunktion entscheidenden Faktoren nicht bekannt, es wird jedoch angenommen, dass die TMDs in diesem Zusammenhang von entscheidender Bedeutung sind. Für die Untersuchung der Substratspezifität von ABC-Transportern mit einer Exportfunktion sind die MDR-ABC-Transporter, die an der Entstehung einer „multidrug resistance“ beteiligten sind, von besonderem Interesse. Der Grund hierfür ist einerseits ihre medizinische Bedeutung bei der Resistenz humaner Tumore gegen eine Chemotherapie. Andererseits ist jedoch auch ihre Fähigkeit ein breites Spektrum von strukturell nicht verwandten Molekülen zu transportieren faszinierend. Zur Untersuchung der „multidrug resistance“ auf einer molekularen Ebene sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit der MDR-ABC-Transporter LmrA aus *L. lactis* als Modellsystem für diese medizinisch relevante Klasse von ABC-Transportern strukturell charakterisiert werden. Die besondere Eignung von LmrA als Modellsystem ergab sich dabei aus seiner funktionalen Austauschbarkeit mit dem Prototypen dieser Klasse von ABC-Transportern, dem humanen P-Glykoprotein.

Zur Analyse der für die Substratspezifität von ABC-Transportern mit einer Importfunktion entscheidenden Faktoren sollte in der vorliegenden Arbeit der für die Aufnahme der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin verantwortliche ABC-Transporter Ehu aus *S. meliloti* studiert werden. Hierfür sollte die Kristallstruktur seines Substratbindeproteins EhuB im Komplex mit seinen Substraten bestimmt werden, um auf diese Weise die molekularen

---

Grundlagen der Substratspezifität dieses ABC-Transporters aufzuklären. Die so gewonnenen Informationen über die Substratbindung sollten sodann mit den aus ähnlichen Substratbindete-proteinen gewonnenen Daten verglichen werden, um so gemeinsame Prinzipien aber auch Unterschiede bei der Bindung von kompatiblen Soluten aufzudecken und einen Beitrag zum molekularen Verständnis der Osmoadaptation zu leisten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid Lösung,<br>30 % (w/v) / 0,8 % (w/v) | Carl Roth |
| Agar                                                                    | Carl Roth |
| Ammoniummolybdat                                                        | Merck     |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS)                                            | Carl Roth |
| Ascorbat                                                                | Sigma     |
| Bromphenolblau                                                          | Carl Roth |
| Chloramphenicol                                                         | Sigma     |
| Complete EDTA free                                                      | Roche     |
| Coomassie Brilliantblau R-250                                           | Carl Roth |
| Coomassie Plus                                                          | Pierce    |
| Essigsäure                                                              | Carl Roth |
| Ethanol                                                                 | Carl Roth |
| Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)                                    | Carl Roth |
| Fleisch-Extrakt                                                         | Carl Roth |
| Glucose                                                                 | Carl Roth |
| Glycerin, 98 %                                                          | Carl Roth |
| Glycin                                                                  | Carl Roth |
| Hefe-Extrakt                                                            | Carl Roth |
| HEPES                                                                   | Carl Roth |
| Imidazol, BioChemika Ultra                                              | Fluka     |
| Magnesiumchlorid                                                        | Fluka     |
| Magnesiumsulfat                                                         | Fluka     |
| Malachitgrün                                                            | Aldrich   |
| Methanol                                                                | Carl Roth |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)                              | Carl Roth |
| Natriumchlorid                                                          | Fluka     |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                                              | Carl Roth |
| Natriumhydroxyd                                                         | Fluka     |
| Pepton aus Casein                                                       | Carl Roth |
| Pepton aus Soja                                                         | Carl Roth |
| Salzsäure, 37 %                                                         | Carl Roth |
| Schwefelsäure, 96 %                                                     | Carl Roth |
| TRIS                                                                    | Carl Roth |
| Tween 20                                                                | Carl Roth |
| $\beta$ -Glycerophosphat                                                | Sigma     |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                                                | Carl Roth |

## Detergenzien

Die verwendeten Detergenzien entsprachen der höchsten Reinheitsstufe des entsprechenden Herstellers.

|                                                         |            |
|---------------------------------------------------------|------------|
| 2-Carboxy- $\omega$ -heptadecenamidopropyldimethylamin  | Anatrace   |
| 6-O-Methyl-n-heptylcarboxyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid | Anatrace   |
| Big CHAP, deoxy                                         | Anatrace   |
| C-DODECAFOS                                             | Anatrace   |
| CHAPSO                                                  | Anatrace   |
| C-HEGA-11                                               | Anatrace   |
| CYFOS-5                                                 | Anatrace   |
| CYFOS-7                                                 | Anatrace   |
| CYGLU-4                                                 | Anatrace   |
| CYMAL-5                                                 | Anatrace   |
| CYMAL-7                                                 | Anatrace   |
| Decyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                        | Anatrace   |
| Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                        | Glycon     |
| Dimethyldecylphosphinoxid                               | Anatrace   |
| Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid                         | Anatrace   |
| Dodecyl-N,N-dimethylglycin                              | Anatrace   |
| Dodecyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                      | Anatrace   |
| Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                      | Glycon     |
| FOS-CHOLINE 12                                          | Anatrace   |
| FOS-CHOLINE 14                                          | Anatrace   |
| FOS-CHOLINE 16                                          | Anatrace   |
| FOSFEN-9                                                | Anatrace   |
| FOS-MEA-10                                              | Anatrace   |
| FOS-MEA-12                                              | Anatrace   |
| HEGA-11                                                 | Anatrace   |
| Hexadecyltrimethylammoniumbromid                        | Fluka      |
| N,N-Dimethyl (3-carboxy-4-dodec-5-ene) amidopropylamin  | Anatrace   |
| Natrium Bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat                  | Fluka      |
| Natrium Cholat                                          | Anatrace   |
| Natrium Dodecanoylsarcosine                             | Anatrace   |
| NP-40                                                   | Calbiochem |
| Octaethylenglycolmonododecylether                       | Anatrace   |
| Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                        | Anatrace   |
| Pentaethylenglycolmonodecylether                        | Anatrace   |
| Sucrose Monododecanoat                                  | Anatrace   |
| Tetradecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid                      | Anatrace   |
| Tetradecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                   | Anatrace   |
| Triton X-100                                            | Sigma      |
| Tween 20                                                | Sigma      |
| Zwittergent 3-10                                        | Calbiochem |
| Zwittergent 3-12                                        | Calbiochem |
| Zwittergent 3-14                                        | Calbiochem |
| Zwittergent 3-16                                        | Calbiochem |

## Chemikalien für die Proteinkristallisation

Die für die Proteinkristallisation verwendeten Chemikalien entsprachen der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe des entsprechenden Herstellers.

|                                         |                  |
|-----------------------------------------|------------------|
| Ammoniumsulfat                          | Fluka            |
| Bicine                                  | Fluka            |
| Cadmiumchlorid                          | Fluka            |
| CAPS                                    | Fluka            |
| CAPSO                                   | Fluka            |
| Ethylenglykol                           | Sigma            |
| HEPES                                   | Fluka            |
| Kalziumchlorid                          | Fluka            |
| Lithiumsulfat                           | Fluka            |
| Magnesiumchlorid                        | Fluka            |
| Magnesiumnitrat                         | Fluka            |
| Magnesiumsulfat                         | Fluka            |
| MES                                     | Fluka            |
| MPD                                     | Hampton Research |
| Natrium Acetat                          | Fluka            |
| Natrium Citrat                          | Fluka            |
| Natrium Malonat                         | Fluka            |
| Natriumchlorid                          | Fluka            |
| Natrium-Kalium Tartrat                  | Fluka            |
| Pentaerythritol Propoxylate (5/4 PO/OH) | Hampton Research |
| PIPES                                   | Fluka            |
| Polyethylenglykol 1500                  | Hampton Research |
| Polyethylenglykol 3350                  | Hampton Research |
| Polyethylenglykol 400                   | Hampton Research |
| Polyethylenglykol 4000                  | Hampton Research |
| Polyethylenglykol 5000 Monomethylether  | Hampton Research |
| Polyethylenglykol 550 Monomethylether   | Hampton Research |
| Polyethylenglykol 8000                  | Hampton Research |
| TRIS                                    | Fluka            |

## Kits für die Proteinkristallisation

|                        |                      |
|------------------------|----------------------|
| Additive Screen        | Hampton Research     |
| Crystal Screen I       | Hampton Research     |
| Crystal Screen II      | Hampton Research     |
| MembFac                | Hampton Research     |
| MemStart & MemSys HT96 | Molecular Dimensions |
| The Mb Class           | Nextal               |
| The Mb Class 2         | Nextal               |

## Inhibitoren und Substrate

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| Adenosin-5'-triphosphat (ATP) | Fluka |
| Ectoin                        | Fluka |
| Hydroxyectoin                 | Fluka |
| Verapamil                     | Fluka |

### 2.1.2 Enzyme und Standards

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Benzonase                     | Merck  |
| Deoxyribonuclease I (DNase I) | Fluka  |
| Lysozym                       | Fluka  |
| Rinderserumalbumin Lösung     | Pierce |

### Molekulargewichtsmarker für den SDS-PAGE

|                                            |               |
|--------------------------------------------|---------------|
| Prestained Protein Molecular Weight Marker | MBI Fermentas |
|--------------------------------------------|---------------|

### Molekulargewichtsmarker für die Gelfiltrationschromatographie

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| Molecular Weight Marker Kit | Sigma |
|-----------------------------|-------|

### 2.1.3 Mikroorganismen, Plasmide und Medien

#### Mikroorganismen

##### *L. lactis*

| <u>Stamm</u> | <u>Referenz</u>          |
|--------------|--------------------------|
| NZ9000       | (Margolles et al., 1999) |
| NZ9700       | (Margolles et al., 1999) |

#### Plasmide

| <u>Plasmid</u> | <u>Eigenschaften</u> | <u>Referenz</u>          |
|----------------|----------------------|--------------------------|
| pNHLmrA        | Cm <sup>R</sup>      | (Margolles et al., 1999) |

#### Medien zur Anzucht von *L. lactis*

Die Medien und Lösungen zur Anzucht von *L. lactis* wurden mit entmineralisiertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert. Das M17-Medium bzw. der M17-Agar wurden sofern nicht angegeben nach dem Autoklavieren mit einer sterilen 10 %igen (w/v) Glucose-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,5 % eingestellt. Die Zugabe von Chloramphenicol erfolgte, falls notwendig, nach dem Autoklavieren.

| <u>M17-Medium</u>             |            | <u>M17-Agar</u>       |          |
|-------------------------------|------------|-----------------------|----------|
| β-Glycerophosphat             | 19,0 g/l   | β-Glycerophosphat     | 19,0 g/l |
| Pepton aus Casein             | 5,0 g/l    | Pepton aus Casein     | 5,0 g/l  |
| Pepton aus Soja               | 5,0 g/l    | Pepton aus Soja       | 5,0 g/l  |
| Fleisch-Extrakt               | 5,0 g/l    | Fleisch-Extrakt       | 5,0 g/l  |
| Hefe-Extrakt                  | 2,5 g/l    | Hefe-Extrakt          | 2,5 g/l  |
| Ascorbat                      | 0,5 g/l    | Ascorbat              | 0,5 g/l  |
| Magnesiumsulfat               | 0,25 g/l   | Magnesiumsulfat       | 0,25 g/l |
|                               |            | Agar                  | 15,0 g/l |
| <u>Chloramphenicol-Lösung</u> |            | <u>Glucose-Lösung</u> |          |
| Chloramphenicol               | 25 mg/ml   | Glucose               | 100 g/l  |
| Ethanol                       | 70 % (v/v) |                       |          |

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Die Puffer wurden mit MilliQ gereinigtem Wasser angesetzt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

|                 |            |                 |            |
|-----------------|------------|-----------------|------------|
| <u>Puffer 1</u> |            | <u>Puffer 2</u> |            |
| HEPES pH 8      | 50 mM      | HEPES pH 7      | 50 mM      |
| Imidazol        | 10 mM      | Imidazol        | 40 mM      |
| NaCl            | 250 mM     | NaCl            | 250 mM     |
| Glycerin        | 10 % (v/v) | Glycerin        | 10 % (v/v) |
| <u>Puffer 3</u> |            | <u>Puffer 4</u> |            |
| HEPES pH 7      | 50 mM      | HEPES pH 7      | 20 mM      |
| Imidazol        | 250 mM     | NaCl            | 100 mM     |
| NaCl            | 250 mM     | Glycerin        | 10 % (v/v) |
| Glycerin        | 10 % (v/v) |                 |            |

### Lösungen für die SDS-PAGE

|                               |              |                               |              |
|-------------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|
| <u>4-fach Trenngelpuffer</u>  |              | <u>4-fach Sammelgelpuffer</u> |              |
| Tris-HCl pH 8,85              | 3,0 M        | Tris-HCl pH 6,8               | 0,5 M        |
| Natriumdodecylsulfat          | 0,4 % (w/v)  | Natriumdodecylsulfat          | 0,4 % (w/v)  |
| <u>Laufpuffer</u>             |              | <u>4-fach Auftragspuffer</u>  |              |
| Tris                          | 0,05 M       | Tris-HCl pH 6,8               | 0,2 M        |
| Glycin                        | 0,19 M       | Natriumdodecylsulfat          | 6 % (w/v)    |
| Natriumdodecylsulfat          | 0,1 % (w/v)  | Glycerin                      | 20 % (v/v)   |
|                               |              | Bromphenolblau                | 0,02 % (w/v) |
|                               |              | β-Mercaptoethanol             | 10 % (v/v)   |
| <u>Coomassie-Lösung</u>       |              | <u>Entfärbelösung</u>         |              |
| Essigsäure                    | 10 % (v/v)   | Essigsäure                    | 10 % (v/v)   |
| Methanol                      | 40 % (v/v)   | Methanol                      | 40 % (v/v)   |
| Coomassie Brilliantblau R-250 | 0,25 % (w/v) |                               |              |

### Lösungen zur Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die für die Bestimmung der ATPase-Aktivität benötigte Malachitgrün-Lösung wurde kurz vor ihrer Verwendung durch gründliches Mischen der Malachitgrün-Lösungen 1, 2 und 3 im Verhältnis 50:12,5:1 erhalten.

|                              |               |                              |             |
|------------------------------|---------------|------------------------------|-------------|
| <u>Malachitgrün-Lösung 1</u> |               | <u>Malachitgrün-Lösung 2</u> |             |
| Malachitgrün                 | 0,122 % (w/v) | Ammoniummolybdat             | 7,5 % (w/v) |
| Schwefelsäure                | 20 % (v/v)    |                              |             |
| <u>Malachitgrün-Lösung 3</u> |               |                              |             |
| Tween 20                     | 11 % (v/v)    |                              |             |

## 2.1.5 Chromatographische Medien und Verbrauchsmaterialien

### Affinitätschromatographie

|                             |               |
|-----------------------------|---------------|
| HiTrap Chelating Säule, 1ml | GE Healthcare |
|-----------------------------|---------------|

### Gelfiltrationschromatographie

|                    |               |
|--------------------|---------------|
| Superose 12 3.2/30 | GE Healthcare |
|--------------------|---------------|

### Verbrauchsmaterialien

|                                    |                  |
|------------------------------------|------------------|
| Amicon Ultra 15 (MWCO 100 kDa)     | Millipore        |
| Amicon Ultra 4 (MWCO 100 kDa)      | Millipore        |
| CryoLoop                           | Hampton Research |
| Crystaldrop Deckel, vorgefettet    | Greiner Bio-One  |
| Crystalquick Platte                | Greiner Bio-One  |
| Dispo Dialyzer, 1 ml (MWCO 50 kDa) | Spectrum         |
| Mikrotiterplatte, 96 Well          | Greiner Bio-One  |
| Spin-X, 0,22 µm                    | Corning          |

## 2.1.6 Instrumente und Geräte

### Chromatographieanlagen

|                          |               |
|--------------------------|---------------|
| FPLC System              | GE Healthcare |
| Äkta Explorer 100 System | GE Healthcare |
| Smart System             | GE Healthcare |

### Optische Geräte

|                                  |                      |
|----------------------------------|----------------------|
| UV-VIS-Spektrometer Cary 50-Bio  | Varian               |
| ELISA-Lesegerät Polarstar Galaxy | BMG Labortechnologie |

### Zentrifugen

|                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| Beckmann L-70      | Beckmann Instruments |
| Sorvall RC-5B Plus | Kendro               |
| Sorvall RC-3C Plus | Kendro               |
| Eppendorf 5804 R   | Eppendorf            |

### Elektrophorese

|                           |                                                 |
|---------------------------|-------------------------------------------------|
| Power Supply EPS 200      | GE Healthcare                                   |
| Elektrophoreseapparaturen | Technische Werkstätten<br>Universität Frankfurt |

### Inkubatoren und Fermenter

|                         |                  |
|-------------------------|------------------|
| Heraeus Brutschrank     | Kendro           |
| Fermenter Biostat UD100 | B. Braun Biotech |

### Andere Geräte

|                                   |                  |
|-----------------------------------|------------------|
| Basic Z System                    | Constant Systems |
| Autoklav 5075 ELVC                | Systemec         |
| Milli-Q <sup>50</sup> Plus Anlage | Millipore        |
| Dewar                             | Taylor-Wharton   |

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Das Expressionssystem

Die homologe Expression des ABC-Transporters LmrA im gram-positiven Milchsäurebakterium *L. lactis* erfolgte auf Basis eines Nisin induzierbaren Expressionssystems (de Ruyter et al., 1996). Dieses zeichnet sich durch eine kaum nachweisbare Expression in Abwesenheit des Induktors und eine starke Expression der Zielproteine im induzierten Zustand aus. Die Grundlage des Nisin induzierbaren Expressionssystems bildet die durch ein Zweikomponenten-Regulationssystem vermittelte Induktion von Genen unter der Kontrolle des *nisA* Promotors (Kunji et al., 2003). Die Expression von LmrA unter Verwendung des beschriebenen Systems im *L. lactis* Stamm NZ9000 erfolgte unter Verwendung des Vektors *pNHLmrA* (Margolles et al., 1999), der das *LmrA* Gen unter der Kontrolle des *nisA* Promotors trägt und zur Selektion eine Chloramphenicol-Resistenz besitzt.

### 2.2.2 Herstellung von Stammkulturen

Zur Herstellung von Stammkulturen, die zur langfristigen Lagerung dienen, wurde der entsprechende *L. lactis* Stamm unter einer Sterilarbeitsbank in einer Petrischale auf M17-Agar ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Im Fall von plasmidtragenden Stämmen wurde ein M17-Agar verwendet, der mit 5 µg/ml Chloramphenicol versetzt war. Nach 24 bis 48 Stunden wurden 100 ml steriles M17-Medium, das im Fall von plasmidtragenden Stämmen mit 5 µg/ml Chloramphenicol versetzt war, mit einer einzelnen Kolonie vom M17-Agar angeimpft und die Kultur für 12 bis 14 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden mehrfach je 800 µl der Kultur mit je 200 µl Glycerin in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß unter einer Sterilarbeitsbank gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.3 Übernachtskultur von *L. lactis*

Aus einer Stammkultur des entsprechenden *L. lactis* Stammes wurden mit einer Impföse 100 oder 200 ml steriles M17-Medium angeimpft, das im Fall von plasmidtragenden Stämmen mit 5 µg/ml Chloramphenicol versetzt war. Anschließend wurde die Kultur für 14 bis 16 Stunden bei 30°C inkubiert.

### 2.2.4 Herstellung von Nisin

Zur Herstellung des Induktors Nisin wurde 1 l steriles M17-Medium mit 30 ml einer stationären Übernachtskultur von *L. lactis* NZ9700 angeimpft und für 8 bis 10 Stunden bei 30°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Kultur für 15 Minuten bei 6000 g und 4°C zentrifugiert und der Nisin enthaltende Überstand in Aliquots bei -20°C gelagert.

### 2.2.5 Expression von LmrA in *L. lactis*

Die Expression von LmrA im *L. lactis* Stamm *NZ9000 pNHLmrA* erfolgte in einem 100 l Maßstab unter Verwendung eines geeigneten Fermenters. Das M17-Medium wurde zu diesem Zweck im Fermenter autoklaviert, wobei das im Medium enthaltene  $\beta$ -Glycerophosphat getrennt von den anderen Komponenten des Mediums sterilisiert wurde. Das auf diese Weise erhaltene Medium wurde mit einer sterilen Glucose- bzw. Chloramphenicol-Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 1 % (w/v) Glucose bzw. 5  $\mu$ g/ml Chloramphenicol versetzt. Für die Expression von LmrA wurde das auf 30°C vorgewärmte Medium mit 3 % (v/v) einer stationären Übernachtskultur des *L. lactis* Stamms *NZ9000 pNHLmrA* angeimpft. Das Wachstum der Bakterien erfolgte bei einer Temperatur von 30°C und einer Luftzufuhr von 2 Liter pro Minute, wobei die Kultur mit 100 Umdrehungen pro Minute des Rührwerks durchmischt wurde. Die Zunahme der Zellmasse wurde durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 660 nm verfolgt. Beim Erreichen einer optischen Dichte von 0,8 wurde die Expression von LmrA durch die Zugabe von 0,4 % (v/v) eines Nisin enthaltenden Überstandes des *L. lactis* Stamms *NZ9700* induziert. Nach einer Induktionsdauer von 1 bis 2 Stunden wurde die Bakteriensuspension in 6 l Schritten für 15 Minuten bei 6000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde in 6 l 100 mM HEPES pH 7,0 resuspendiert und für 20 Minuten bei 6000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut wie beschrieben mit 100 mM HEPES pH 7,0 gewaschen. Das erhaltene Bakterienpellet wurde in 0,7 % des Kulturvolumens 100 mM HEPES pH 7,0 resuspendiert und in Aliquots, die einem Kulturvolumen von 15 l entsprachen, tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Coomassie Plus Lösung mit Hilfe einer modifizierten Bradford Methode (Bradford, 1976). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben im Mikrotiterplatten Format. Die zur Berechnung der Konzentration notwendige Eichgerade wurde durch die Doppelbestimmung einer Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin als Proteinstandard erhalten. Zur Konzentrationsbestimmung wurden je 10  $\mu$ l der verschiedenen Lösungen des Proteinstandards und der zu bestimmenden Proteinlösungen in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorgelegt, wobei Proteinlösungen mit einer Konzentration außerhalb des Messbereichs entsprechend verdünnt wurden. Die auf diese Weise vorbereiteten Ansätze wurden mit je 300  $\mu$ l Coomassie Plus Lösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Absorptionen der verschiedenen Lösungen bei 584 nm gemessen. Zur Auswertung wurden die gemessenen Absorptionen auf den Hintergrund korrigiert, indem von allen erhaltenen Absorptionen die gemittelte Absorption des Proteinstandards ohne Rinderserumalbumin subtrahiert wurde. Die Steigung und der Achsen-

abschnitt der aus den gemittelten Werten des Proteinstandards erhaltenen Eichgerade wurden für den linearen Bereich von 0 bis 750 µg/ml mittels linearer Regression bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe von Gleichung (2.1):

$$\text{Konzentration} = \frac{\text{Probe} - \text{Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}} \quad (2.1)$$

### 2.3.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mittels Ultrafiltration unter Verwendung von Amicon Ultra Konzentratoren mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von 100 kDa und einer Membran aus regenerierter Zellulose. In Abhängigkeit vom zu konzentrierenden Volumen wurden 4 ml oder 15 ml Konzentratoren verwendet. Die Proteinlösungen wurden in den Konzentratoren bei 2000 bis 3000 g und 4°C bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration zentrifugiert.

### 2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), wobei die Proteine im Anschluss an ihre Auftrennung durch eine Färbung mit Coomassie Brilliantblau R-250 sichtbar gemacht wurden. Die diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) wurde dabei mit einem von Fling und Gregerson eingeführten modifizierten Puffersystem durchgeführt (Fling und Gregerson, 1986).

#### Herstellung der Gele

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurden achtmal je zwei Glasplatten (10 cm x 8 cm) getrennt von je zwei Abstandhaltern (Dicke: 1 mm) in einen Gießblock eingebaut. Anschließend wurde die Lösung für die 10 bzw. 12 %igen Trenngele aus 18,75 ml vierfach Trenngelpuffer sowie 25 ml bzw. 30 ml einer 30 %igen Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid Lösung hergestellt und mit MilliQ-Wasser auf das Endvolumen von 75 ml aufgefüllt. Die Polymerisation der Trenngel-Lösung wurde durch die Zugabe von 100 µl TEMED und 300 µl einer 10 % (w/v) APS-Lösung gestartet, die Lösung in den Gießblock mit den Glasplatten gefüllt und jedes Gel mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, die Trenngele mit MilliQ-Wasser gewaschen und mit Hilfe von Filterpapieren getrocknet. Im nächsten Schritt wurde eine 4,5 %ige Sammelgel-Lösung aus 8,75 ml vierfach Sammelgelpuffer, 5,25 ml einer 30 % igen Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid Lösung und 21 ml MilliQ-Wasser hergestellt. Die Polymerisation der Sammelgel-Lösung wurde durch die Zugabe von 70 µl TEMED und 210 µl einer 10 % (w/v) APS-Lösung gestartet, die Sammelgel-Lösung auf die polymerisierten Trenngele gegeben und Platzhalter für 10 oder 15 Probenaschen eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisation wurden die Gele aus dem Gießblock entfernt und in Papiertüchern, die mit Laufpuffer getränkt waren, bei 4°C gelagert.

## Elektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts wurden maximal 15 µl Probe mit 5 µl vierfach Auftragspuffer versetzt und auf ein Endvolumen von 20 µl mit MilliQ-Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten auf 37°C erhitzt, um eine Aggregation der Membranproteine bei höheren Temperaturen in Gegenwart von SDS zu verhindern. Für die Elektrophorese wurde der Platzhalter aus dem 10 bzw. 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel entfernt, das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer eingebaut und diese mit Laufpuffer gefüllt. Die vorbereiteten Proben und kommerziell erhältliche Molekulargewichtsmarker wurden sodann nacheinander mit einer 100 µl Glasspritze, die nach jeder Probe mit Laufpuffer gespült wurde, in die von den Platzhaltern geformten Taschen des Gels gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 130 V, bis die durch das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau gekennzeichnete Lauffront am Ende des Gels austrat.

## Coomassie-Färbung

Die Anfärbung der durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteine im Gel erfolgte mit Hilfe von Coomassie Brilliantblau R-250. Zu diesem Zweck wurde das Gel für 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur in Coomassie-Lösung geschüttelt. Anschließend wurde das Gel zur Entfernung von ungebundenem Farbstoff mehrfach in frischer Entfärbelösung geschüttelt, bis der Hintergrund des Gels farblos war.

### 2.3.4 Analytische Reinigung von LmrA

Für die Reinigung von LmrA wurden die aus einem Kulturvolumen von 15 l erhaltenen bei -80°C gelagerten *L. lactis* mit warmem Wasser aufgetaut. Die erhaltene Suspension wurde mit 10 mg/ml Lysozym und 0,1 mg/ml DNase I versetzt, gründlich durchmischt und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Bakterien wurden, nachdem sie 10 Minuten auf Eis gekühlt worden waren, mittels einer dreimaligen Passage durch ein auf 4°C gekühltes Basic Z System bei einem Druck von 2500 bar aufgeschlossen. Intakte Bakterien und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugationsschritte von 45 Minuten bei 13000 g und 4°C sowie von 45 Minuten bei 25000 g und 4°C entfernt. Der Überstand wurde zur Sedimentierung der Membranen für 60 Minuten bei 125000 g und 4°C zentrifugiert.

| Detergens                                               | Konzentration Solubilisierung | Konzentration für die Affinitätschromatographie |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------|
| 2-Carboxy- $\omega$ -heptadecenamidopropyl-dimethylamin | 1 %                           | 0,00095 % (2,5x cmc)                            |
| 6-O-Methyl-n-heptylcarboxyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid | 1 %                           | 0,345 % (1,5x cmc)                              |
| Big CHAP, deoxy                                         | 1 %                           | 0,24 % (2,0x cmc)                               |
| C-DODECAFOS                                             | 2 %                           | 0,77 % (1,0x cmc)                               |
| CHAPSO                                                  | 2 %                           | 0,75 % (1,5x cmc)                               |
| C-HEGA-11                                               | 1 %                           | 0,495 % (1,1x cmc)                              |
| CYFOS-5                                                 | 1 %                           | 0,375 % (2,5x cmc)                              |
| CYFOS-7                                                 | 1 %                           | 0,055 % (2,5x cmc)                              |
| CYGLU-4                                                 | 1 %                           | 0,145 % (2,5x cmc)                              |
| CYMAL-5                                                 | 1 %                           | 0,300 % (2,5x cmc)                              |
| CYMAL-7                                                 | 1 %                           | 0,02475 % (2,5x cmc)                            |

| Detergens                                              | Konzentration Solubilisierung | Konzentration für die Affinitätschromatographie |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------|
| Decyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                       | 1 %                           | 0,175 % (2,5x cmc)                              |
| Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                       | 1 %                           | 0,2175 % (2,5x cmc)                             |
| Dimethyldecylphosphinoxid                              | 1 %                           | 0,25 % (2,5x cmc)                               |
| Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid                        | 1 %                           | 0,0575 % (2,5x cmc)                             |
| Dodecyl-N,N-dimethylglycin                             | 1 %                           | 0,1025 % (2,5x cmc)                             |
| Dodecyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                     | 1 %                           | 0,0165 % (2,5x cmc)                             |
| Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                     | 1 %                           | 0,02 % (2,3x cmc)                               |
| FOS-CHOLINE 12                                         | 1 %                           | 0,1175 % (2,5x cmc)                             |
| FOS-CHOLINE 14                                         | 1 %                           | 0,0115 % (2,5x cmc)                             |
| FOS-CHOLINE 16                                         | 1 %                           | 0,001325 % (2,5x cmc)                           |
| FOSFEN-9                                               | 1 %                           | 0,13 % (2,5x cmc)                               |
| FOS-MEA-10                                             | 1 %                           | 0,375 % (2,5x cmc)                              |
| FOS-MEA-12                                             | 1 %                           | 0,035 % (2,5x cmc)                              |
| HEGA-11                                                | 1 %                           | 0,1375 % (2,5x cmc)                             |
| Hexadecyltrimethylammoniumbromid                       | 1 %                           | 0,091 % (2,5x cmc)                              |
| N,N-Dimethyl (3-carboxy-4-dodec-5-ene) amidopropylamin | 1 %                           | 0,0178 % (2,5x cmc)                             |
| Natrium Bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat                 | 1 %                           | 0,2 %                                           |
| Natrium Cholat                                         | 2 %                           | 0,41 % (1,0x cmc)                               |
| Natrium Dodecanoylsarcosine                            | 1 %                           | 0,42 % (1,0x cmc)                               |
| NP-40                                                  | 1 %                           | 0,125 %                                         |
| Octaethylenglycolmonododecylether                      | 1 %                           | 0,0120 % (2,5x cmc)                             |
| Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                       | 1 %                           | 1,06 % (2,0x cmc)                               |
| Pentaethylenglycolmonodecylether                       | 1 %                           | 0,0775 % (2,5x cmc)                             |
| Sucrose Monododecanoat                                 | 1 %                           | 0,04 % (2,5x cmc)                               |
| Tetradecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid                     | 1 %                           | 0,01875 % (2,5x cmc)                            |
| Tetradecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                  | 1 %                           | 0,00135 % (2,5x cmc)                            |
| Triton X-100                                           | 1 %                           | 0,0375 % (2,5x cmc)                             |
| Tween 20                                               | 1 %                           | 0,018 % (2,5x cmc)                              |
| Zwittergent 3-10                                       | 2 %                           | 1,230 % (1,0x cmc)                              |
| Zwittergent 3-12                                       | 1 %                           | 0,335 % (2,5x cmc)                              |
| Zwittergent 3-14                                       | 1 %                           | 0,0175 % (2,5x cmc)                             |
| Zwittergent 3-16                                       | 1 %                           | 0,0059 % (2,5x cmc)                             |

Tab. 2.1: Detergenzien zur Reinigung von LmrA. Gezeigt sind die verwendeten Detergenzien sowie ihre zur Solubilisierung und Affinitätsreinigung eingesetzten Konzentrationen (in Gewichtsprozenten). Die Konzentrationen sind zusätzlich – soweit bekannt – in Vielfachen der kritischen Mizellenkonzentration (cmc) angegeben.

Die erhaltenen Membranpellets wurden bei 4°C in 5 ml Puffer 1 unter Verwendung eines Potters homogenisiert. Anschließend wurde je ein Drittel dieser Suspension, soweit nicht anders angegeben, in insgesamt 10 ml Puffer 1 mit einem der in Tab. 2.1 gezeigten Detergenzien in der angegebenen Konzentration für 30 Minuten bei 4°C unter mehrfachem Invertieren solubilisiert. Die erhaltene Suspension wurde zur Abtrennung der nicht gelösten Bestandteile für 30 Minuten bei 125000 g und 4°C zentrifugiert. Die Reinigung von LmrA aus dem erhaltenen Überstand erfolgte mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung seines amino-terminalen „Hexahistidin-Tag“, wobei alle Puffer mit der in Tab. 2.1 angegebenen Konzentration des zur Reinigung verwendeten Detergens versetzt wurden. Der Überstand wurde bei 4°C mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine mit Zn<sup>2+</sup> beladene und mit Puffer 1 mit Detergens äquilibrierte 1 ml HiTrap Chelating Säule unter Verwendung eines FPLC Systems aufgetragen. Die nicht spezifisch gebundenen Proteine

wurden durch einen Waschschriff mit 10 ml Puffer 2 mit Detergens bei einer Flussrate von 1 ml/min entfernt. Die Elution der spezifisch an das Säulenmaterial gebundenen Proteine erfolgte durch Puffer 3 mit Detergens, wobei das Eluat in Fraktionen von 1 ml zur weiteren Analyse gesammelt wurde.

### 2.3.5 Präparative Reinigung von LmrA

Die aus einem Kulturvolumen von 15 l erhaltenen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten *L. lactis* wurden im Zuge der präparativen Reinigung von LmrA mit warmem Wasser aufgetaut und mit zwei Tabletten des Proteaseinhibitors Complete EDTA free und 2 mM EDTA versetzt. Die erhaltene Suspension wurde mit 10 mg/ml Lysozym und 0,1 mg/ml DNase I versetzt, gründlich durchmischt und 30 Minuten bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Bakterien wurden, nachdem sie 10 Minuten auf Eis gekühlt worden waren, mit zwei Tabletten des Proteaseinhibitors Complete EDTA free versetzt. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte mittels einer dreimaligen Passage durch ein auf  $4^{\circ}\text{C}$  gekühltes Basic Z System bei einem Druck von 2500 bar. Intakte Bakterien und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugationsschritte von 45 Minuten bei 13000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  sowie von 45 Minuten bei 25000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  entfernt. Der Überstand wurde zur Sedimentierung der Membranen für 60 Minuten bei 125000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die erhaltenen Membranpellets wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  in 5 ml Puffer 1 mit einer Tablette des Proteaseinhibitors Complete EDTA free unter Verwendung eines Potters homogenisiert. Die Proteinkonzentration der Suspension wurde wie im Abschnitt 2.3.1 beschrieben ermittelt. Anschließend wurde die Suspension in Puffer 1 mit 1 % FOS-CHOLINE 16 für 30 Minuten mit einem Protein zu Detergens Verhältnis von 1,5:1 unter mehrfachem Invertieren bei  $4^{\circ}\text{C}$  solubilisiert. Die Suspension wurde zur Abtrennung der nicht gelösten Bestandteile für 30 Minuten bei 125000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die Reinigung von LmrA aus dem erhaltenen Überstand erfolgte mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung seines amino-terminalen „Hexahistidin-Tag“. Hierfür wurde der Überstand bei einer Flussrate von 1 ml/min gleichmäßig auf sechs mit  $\text{Zn}^{2+}$  beladene und mit Puffer 1 mit 0.001325 % FOS-CHOLINE 16 äquilibrierte 1 ml HiTrap Chelating Säulen unter Verwendung eines Äkta Explorer aufgetragen. Anschließend wurden die nicht spezifisch gebundenen Proteine durch Waschschriffe mit je 14 ml Puffer 2 mit 0.001325 % FOS-CHOLINE 16 bei einer Flussrate von 1 ml/min entfernt. Die Elution der spezifisch an das Säulenmaterial gebundenen Proteine erfolgte durch Puffer 3 mit 0.001325 % FOS-CHOLINE 16, wobei das Eluat in Fraktionen von 1 ml gesammelt wurde.

Nach der Bestimmung der Konzentrationen wurden die Protein enthaltenden Fraktionen vereinigt und in einem Amicon Ultra 15 Konzentrador mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von 100 kDa auf ungefähr 10 mg/ml konzentriert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde in einem 1 ml Dispo Dialyzer mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von 50 kDa für 12 bis 16 Stunden gegen 500 ml Puffer 4 mit 0.001325 % FOS-CHOLINE 16 unter leichtem Rühren bei  $4^{\circ}\text{C}$  dialysiert. Die erhaltene Proteinlösung wurde im gleichen Dispo Dialyzer erneut für 3 bis 6 Stunden gegen 400 ml frischen Puffer 4 mit 0.001325 % FOS-CHOLINE 16 unter leichtem Rühren bei  $4^{\circ}\text{C}$  dialysiert. Abschließend wurde die

Proteinlösung bei 2000 bis 3000 g und 4°C durch einen Spin-X Filter mit einer Porengröße von 0.22 µm zentrifugiert.

### 2.3.6 Analytische Gelfiltrationschromatographie

Die analytische Gelfiltrationschromatographie der verschiedenen LmrA Präparationen erfolgte unter Verwendung einer Superose 12 3.2/30 Säule bei einer Flussrate von normalerweise 50 µl/min unter Temperaturkontrolle in einem Smart System. Die Gelfiltrationssäule wurde vor jedem Lauf bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie mit Puffer 4 – versetzt mit der in *Tab. 2.1* angegebenen Konzentration des zur Reinigung verwendeten Detergens – äquilibriert. Zur Analyse der zu untersuchenden Probe wurde diese mit Hilfe einer entsprechenden Probenschleife auf die Superose 12 Säule aufgetragen und das Chromatogramm über ein Volumen von 2,5 ml aufgezeichnet. Bei Bedarf wurden dabei Fraktionen zur Analyse des Eluats gesammelt.

Die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule in Bezug auf das Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe löslicher Referenzproteine bekannter molekularer Masse, die wie beschrieben mit Puffer 4 ohne Detergens analysiert wurden. Die dazu verwendeten Referenzproteine waren: Carboanhydrase (29 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa), β-Amylase (200 kDa), Apoferritin (443 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa).

### 2.3.7 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität von LmrA erfolgte auf Basis des im Zuge der Reaktion freigesetzten anorganischen Phosphats. Zu diesem Zweck wurde die Reaktion nach unterschiedlichen Zeiten durch Zugabe von verdünnter Schwefelsäure gestoppt und die Menge an freigesetztem anorganischen Phosphat durch Komplexbildung mit einer Malachitgrün-Ammoniummolybdat-Lösung spektroskopisch bestimmt (Baykov et al., 1988). Für die Bestimmung der ATPase-Aktivität wurden 1 bis 25 µl der zu untersuchenden Proben in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit jeweils 2 µl einer 100 mM ATP Lösung versetzt. Die Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde für jede Probe in Gegenwart und Abwesenheit von Verapamil durchgeführt, wofür einer der Ansätze zusätzlich mit 1 µl einer 10 mM Verapamil Lösung versetzt wurde. Die auf diese Weise vorbereiteten Ansätze wurden mit Puffer 4 versetzt mit der in *Tab. 2.1* angegebenen Konzentration des zur Reinigung verwendeten Detergens auf ein Gesamtvolumen von 199 µl aufgefüllt. Die Kontrolle des Hintergrunds erfolgte mit Hilfe eines Ansatzes ohne Zusatz von Protein. Die ATP-Hydrolyse in den Ansätzen wurde durch die Zugabe von 1 µl einer 1 M Magnesiumchlorid-Lösung gestartet und die Reaktion nach 0, 30 und 60 Minuten bei Raumtemperatur beendet. Zu diesem Zweck wurden nach den angegebenen Zeiten je zweimal 25 µl eines jeden Ansatzes in je 175 µl 10 mM Schwefelsäure überführt. Zur Bestimmung einer Eichgerade wurden zweimal je 25 µl einer Verdünnungsreihe von Natriumphosphat mit Konzentrationen von 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM und 0 µM mit je 175 µl 10 mM Schwefelsäure gemischt. Nach Beendigung aller Reaktionen wurden die Ansätze mit je 50 µl frisch

angesetzter Malachitgrün-Lösung versetzt und gründlich durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 bis 15 Minuten wurden die Absorptionen der Ansätze bei 620 nm gemessen. Die Steigung der Eichgerade wurde aus den Absorptionen des Natriumphosphat-Standards mittels linearer Regression bestimmt. Anhand von Gleichung (2.2) wurden die spezifischen ATPase-Aktivitäten der untersuchten Proben in  $\mu\text{mol}$  freigesetztem Phosphat pro Minute und pro mg Protein errechnet.

$$\text{Aktivität} = \frac{\frac{(\text{Abs}(\text{LmrA})_t - \text{Abs}(\text{LmrA})_{t=0})}{\text{Steigung}}}{\frac{\text{Konzentration} * \text{Volumen} * t}{1000 * 8}} \frac{(\text{Abs}(\text{Kontrolle})_t - \text{Abs}(\text{Kontrolle})_{t=0})}{\text{Steigung}} \quad (2.2)$$

## 2.4 Kristallographische Methoden

### 2.4.1 Physikalische Grundlagen der Kristallisation

Die Löslichkeitsgrenze einer festen Substanz in einem gegebenen Lösungsmittel bezeichnet den Punkt an dem eine weitere Zugabe der Substanz nicht zu einer weiteren Erhöhung der Konzentration im Lösungsmittel führt. An diesem Punkt stehen die gelöste und die feste Form der Substanz im Gleichgewicht. Dieses bedeutet, dass es keinen Nettoaustausch zwischen den beiden Phasen gibt. Eine Lösung, in der die Konzentration unter den gegebenen Bedingungen genau der Löslichkeitsgrenze entspricht, wird als gesättigte Lösung bezeichnet.

Durch eine Veränderung der Umgebungsbedingungen, wie der Temperatur oder der Konzentration eines Fällungsmittels, ist es möglich eine Lösung zu erzeugen, in der die Konzentration über dem von der Löslichkeitsgrenze gegebenen Limit liegt. Eine solche Lösung wird als übersättigte Lösung bezeichnet und stellt einen Nicht-Gleichgewichtszustand dar. Aus thermodynamischer Sicht ist eine solche Lösung nicht stabil und sollte unter Bildung einer festen Phase in den Gleichgewichtszustand – die gesättigte Lösung – zurückkehren. Dass dieses nicht unmittelbar geschieht, liegt in der für den Phasenübergang in den festen Zustand notwendigen Aktivierungsenergie begründet. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Aktivierungsenergie aufgebracht wird und das System in den Gleichgewichtszustand zurückkehrt, steigt mit dem Übersättigungsgrad der Lösung und der somit steigenden thermodynamischen Triebkraft. Auf Grund der mit dem Grad der Übersättigung steigenden Fähigkeit Kristallisationskeime zu bilden wird der übersättigte Bereich in dem in *Abb. 2.1* gezeigtem Phasendiagramm einer Proteinlösung in einen labilen und einen metastabilen Bereich unterteilt. Bei moderater Übersättigung der Lösung im metastabilen Bereich sind Kristallisationskeime in der Lage zu wachsen, können bei diesem Grad der Übersättigung aber nicht gebildet werden. Erst bei größerer Übersättigung im labilen Bereich können sich spontan Kristallisationskeime bilden und wachsen.

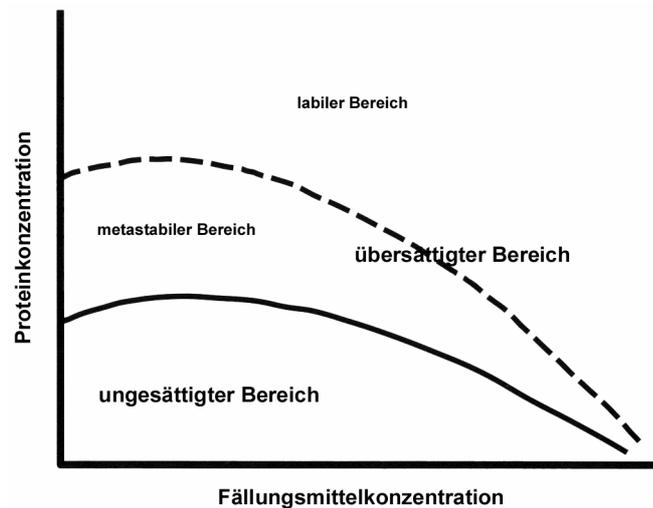


Abb. 2.1: Das Phasendiagramm einer Proteinlösung zeigt einen ungesättigten und einen übersättigten Bereich. Der übersättigte Bereich der Proteinlösung kann in einen metastabilen und einen labilen Bereich unterteilt werden (modifiziert nach (McPherson, 1999)).

Im Unterschied zur Kristallisation der meisten niedermolekularen Substanzen wird dabei die Bildung von Proteinkristallen aus einer übersättigten Lösung von der Tatsache erschwert, dass sich bei Proteinen eine weitere, kinetisch bevorzugte feste Phase – der amorphe Niederschlag – bilden kann. Die Wahrscheinlichkeit für die Bildung des amorphen Niederschlages steigt mit dem Grad der Übersättigung.

Zusammenfassend ist ein Kristallwachstum somit lediglich aus einer übersättigten, nicht im Gleichgewicht befindlichen Lösung möglich, wobei die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Kristallisationskeimen mit dem Grad der Übersättigung der Lösung steigt. Im Spezialfall der Bildung von Proteinkristallen kommt jedoch erschwerend die Bildung eines – im Gegensatz zu Kristallen – kinetisch bevorzugten amorphen Niederschlags hinzu.

### Wege zur Übersättigung einer Proteinlösung

Eine notwendige Voraussetzung zur Kristallisation von Proteinen ist es, eine in Bezug auf das Makromolekül übersättigte Lösung zu erzeugen. Zu diesem Zweck werden die Eigenschaften einer ungesättigten Proteinlösung in einer Weise verändert, die zu einer Übersättigung führt. Dieses kann unter anderem auf den folgenden Wegen erreicht werden:

- Veränderung der Temperatur
- Veränderung des pH-Wertes
- Erniedrigung der Salzkonzentration („Einsalzen“)
- Erhöhung der Salzkonzentration („Aussalzen“)
- Veränderung der dielektrischen Eigenschaften
- Zugabe eines Polymers mit Volumenausschluss-Effekt

Eine der im Rahmen der Proteinkristallisation am häufigsten zur Übersättigung einer Proteinlösung verwendeten Methoden ist die Zugabe eines Fällungsmittels, das seine Wirkung auf den letzten drei oben genannten Wegen entfalten kann.

Die Fällungsmittel können in drei Klassen eingeteilt werden:

- Salze
- organische Lösungsmittel
- Polymere
- Kristallisationsmethoden

Für die Kristallisation von Proteinen sind im Laufe der Jahre eine Reihe von Verfahren entwickelt worden, von denen einige der gebräuchlichsten im Folgenden vorgestellt werden.

### **„Batch“ Kristallisation**

Die vom Aufbau einfachste Methode zur Kristallisation von Proteinen ist die „Batch“ Methode. Sie basiert auf dem sprunghaften Erzeugen einer in Bezug auf das Protein übersättigten Lösung, aus der sich Kristalle bilden können. Dieses wird meistens durch das Mischen einer ungesättigten Proteinlösung mit der Lösung eines geeigneten Fällungsmittels erreicht.

Alternativ kann die Übersättigung der Lösung in Bezug auf das Protein auch durch die Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Lösung erreicht werden.

### **Kristallisation durch Dialyse**

Im Gegensatz zur sprunghaften Übersättigung der Proteinlösung bei der „Batch“ Methode erfolgt diese während der Dialyse vergleichsweise langsam und kontinuierlich. Für die Dialyse wird die Proteinlösung in einem Behältnis mit einer semipermeablen Membran eingeschlossen. Diese Membran erlaubt den Austausch von niedermolekularen Bestandteilen, nicht aber die Passage von Proteinen. Wird das Behältnis mit der Proteinlösung in ein großes Volumen einer Lösung gegeben, die in Bezug auf den pH-Wert, die Ionenstärke oder die Polymerkonzentration die gewünschten Eigenschaften hat, so erhält die Proteinlösung im Zuge der Gleichgewichtseinstellung diese Eigenschaften. Auf diese Weise kann eine langsame Übersättigung der Lösung erreicht werden und so die Grundlage für die Kristallisation des Proteins geschaffen werden.

### **Kristallisation durch Dampfdiffusion**

Die Dampfdiffusion stellt in ihren verschiedenen Formen das am häufigsten verwendete Verfahren zur Kristallisation von Proteinen dar. Bei dieser stellt sich ein Gleichgewicht zwischen einem Tropfen Proteinlösung und einer räumlich getrennten Reservoirolösung in einem geschlossenen System über die gasförmige Phase ein, wobei die Reservoirolösung ein sehr viel größeres Volumen als die Proteinlösung besitzt. Die Reservoirolösung enthält im Allgemeinen ein Fällungsmittel sowie eine Puffersubstanz und stellt auf Grund der Volumenunterschiede den Endpunkt der Gleichgewichtseinstellung dar. Der Tropfen kann neben der Proteinlösung und dem Fällungsmittel der Reservoirolösung einen Puffer, sowie weitere chemische und biochemische Bestandteile enthalten. Im Zuge der Einstellung des Gleichgewichts zwischen dem Tropfen und der Reservoirolösung werden die Eigenschaften der Proteinlösung in einer Weise verändert, die zu einer Übersättigung der Lösung in Bezug auf das Makromolekül führen können und somit die Bildung von Kristallen ermöglichen. Bei der auf einer Dampfdiffusion beruhenden Kristallisation werden zwei gängige Verfahren unterschieden. Das erste verwendet einen von einer Oberfläche unterstützten Tropfen und wird deshalb als „sitzender Tropfen“

(engl. sitting drop) bezeichnet. Im zweiten Aufbau wird ein von einer Oberfläche herabhängender Tropfen benutzt, weshalb diese Variante „hängender Tropfen“ (engl. hanging drop) genannt wird.

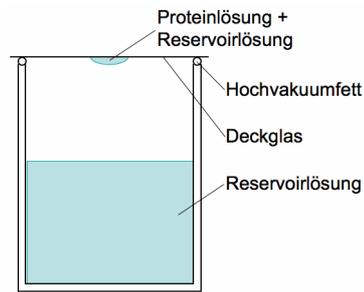


Abb. 2.2: schematischer Aufbau eines Dampfdiffusionsexperiments nach der Methode des hängenden Tropfens.

### Strategien zur Suche nach Kristallisationsbedingungen

Die Suche nach Kristallisationsbedingungen von Proteinen erfolgt in der Regel nach dem Prinzip von Versuch und Irrtum. Für die Suche nach ersten Bedingungen zur Kristallisation von Proteinen werden dabei verschiedene Strategien eingesetzt, von denen zwei sehr unterschiedliche im Folgenden beschrieben werden.

#### „Grid screen“

Die zur systematischen Suche nach Kristallisationsbedingungen eingesetzten „grid screens“ basieren in der Regel auf zweidimensionalen Matrizen von Lösungen, bei denen zwei Parameter entlang der Achsen variiert werden. Die Suche nach Kristallisationsbedingungen unter Verwendung dieser Strategie erfolgt oft in einem iterativen Prozess. Dieser beginnt mit einem weiten Gitter, bei dem sich die einzelnen Bedingungen stark unterscheiden und endet mit einem engen Gitter von sehr ähnlichen Bedingungen. Die Auswahl der im nächsten Gitter verwendeten Bedingungen erfolgt auf Grundlage der aus dem aktuellen Gitter erhaltenen Ergebnisse. Für die anfängliche Suche nach Kristallisationsbedingungen mit dieser Methode werden in der Regel Gitter verwendet, in denen die Fällungsmittelkonzentration gegen den pH-Wert der Lösung variiert wird. Der große Nachteil des geschilderten systematischen Verfahrens ist der hohe Proteinverbrauch bei der Suche nach Kristallisationsbedingungen, für den Fall, dass nicht frühzeitig geeignete Bedingungen gefunden werden.

#### „Sparse matrix screen“

Im Unterschied zu den systematischen „grid screens“ versuchen „sparse matrix screens“ (Jancarik und Kim, 1991) durch eine Kombination sehr unterschiedlich zusammengesetzter Lösungen eine möglichst große Zahl von Parametern bei der Suche nach Kristallisationsbedingungen zu untersuchen. Die Auswahl der verschiedenen Lösungen erfolgt dabei normalerweise auf Grundlage ihres Erfolgs bei der Proteinkristallisation. Auf Grund der großen Vielfalt der in ihnen enthaltenen Lösungen werden „sparse matrix screens“ häufig bei der Suche nach anfänglichen Bedingungen zur Kristallisation von Proteinen eingesetzt.

### 2.4.2 Kristallisation von EhuB im Komplex mit einem seiner Substrate

Alle Kristallisationsversuche von EhuB im Komplex mit einem seiner Substrate Ectoin oder Hydroxyectoin erfolgten als Dampfdiffusionsexperimente nach der Methode des hängenden Tropfens. Die hierfür verwendeten Proteinlösungen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. E. Bremer (Universität Marburg) im Rahmen einer Kooperation bereitgestellt, wobei die zur Kristallisation verwendeten EhuB Lösungen eine Konzentration von 10 bis 40 mg/ml hatten. Für die Kristallisation des Komplexes von EhuB mit einem seiner Substrate wurde die in 10 mM Tris pH 7,0 vorliegende konzentrierte Proteinlösung auf eine Endkonzentration von 1 mM Ectoin bzw. Hydroxyectoin eingestellt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl der Reservoirlösungen in die Vertiefungen einer 96-Well Crystalquick Platte vorgelegt. Auf einem vorgefetteten Crystaldrop Deckel wurden 1 µl der Proteinlösung und 1 µl der entsprechenden Reservoirlösung bei 4°C unter Verwendung einer Mehrkanalpipette gemischt. Nach Abschluss der Kristallisation wurde der vorgefettete Crystaldrop Deckel auf die Crystalquick Platte mit den Reservoirlösungen aufgesetzt, luftdicht verschlossen und der Ansatz bei einer Temperatur von 4°C gelagert.

Die anfängliche Suche nach Kristallisationsbedingungen für den Komplex von EhuB mit einem seiner Substrate erfolgte unter Verwendung der kommerziell erhältlichen „sparse matrix screens“ Crystal Screen I und II.

### 2.4.3 Kristallisation von Selenomethionin-markiertem EhuB

Die Kristallisationsversuche von Selenomethionin-markiertem EhuB im Komplex mit seinem Substrat Ectoin erfolgten als Dampfdiffusionsexperimente nach der Methode des hängenden Tropfens, wobei die hierzu verwendete Selenomethionin-markierte Proteinlösung von der Arbeitsgruppe von Prof. E. Bremer (Universität Marburg) bereitgestellt wurde. Für die Kristallisation des Komplexes von Selenomethionin-markiertem EhuB mit seinem Substrat Ectoin wurde die auf 7 mg/ml konzentrierte Proteinlösung auf eine Konzentration von 1 mM Ectoin eingestellt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Kristallisation des Selenomethionin-markierten Proteins erfolgte mit dem für das native Protein beschriebenen Aufbau unter Verwendung der zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen des nativen Proteins verwendeten „grid screens“.

### 2.4.4 Kristallisation von LmrA

Alle Kristallisationsexperimente des integralen Membranproteins LmrA erfolgten in Form von Dampfdiffusionsexperimenten nach der Methode des hängenden Tropfens. Für die Kristallisation wurde normalerweise das aus der präparativen Reinigung erhaltene LmrA mit einer Konzentration von 6 bis 12 mg/ml verwendet. Die Kristallisationsexperimente von LmrA erfolgten in der Regel parallel bei einer Temperatur von 4°C und 22°C. Für die Kristallisation wurden je 200 µl der Reservoirlösungen ohne Zusatz von Detergens in die Vertiefungen einer 96-Well Crystalquick Platte vorgelegt. Auf einem vorgefetteten Crystaldrop Deckel wurden bei einer Temperatur von 4°C normalerweise je 1 µl der Proteinlösung mit je 1 µl der Reser-

voirlösung unter Verwendung einer Mehrkanalpipette gemischt. Nach Abschluss der Kristallisation wurde der vorgefettete Crystaldrop Deckel auf die Platte mit den Reservoirlösungen aufgesetzt, luftdicht verschlossen und der Ansatz bei der entsprechenden Temperatur gelagert. Die Suche nach Kristallisationsbedingungen für LmrA erfolgte unter Verwendung der kommerziell erhältlichen „sparse matrix screens“ MembFac, The MbClass, The MbClass2 und MemStart & MemSys. Zusätzlich zu diesen „sparse matrix screens“ wurden 22 eigene „grid screens“ mit je 96 Lösungen auf Basis erfolgreicher Kristallisationsbedingungen von Membranproteinen entwickelt und für die Suche nach Kristallisationsbedingungen von LmrA verwendet.

### 2.4.5 Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse

In den folgenden Abschnitten werden die Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse beschrieben. Auf Grund der Komplexität der Materie ist jedoch im Rahmen dieser Arbeit in vielen Fällen keine physikalische Herleitung der Zusammenhänge möglich. Hier sei lediglich auf weiterführende Literatur verwiesen (Blow, 2002; Drenth, 1999; Woolfson, 1997).

#### Kristalle, Raumgruppen und Kristallsysteme

Ein Kristall besteht aus einer dreidimensionalen sich periodisch wiederholenden Anordnung von Molekülen, welche auf diese Weise eine Gittersymmetrie erzeugen. Die der Gittersymmetrie zugrunde liegenden Translationen werden durch die drei Vektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  beschrieben, die die Einheitszelle, den sich wiederholenden Baustein des Kristalls, aufspannen. Innerhalb der Einheitszelle können Kristalle weitere Symmetrieelemente enthalten, die sie in mehrere asymmetrische Einheiten teilen, die keine interne Symmetrie besitzen und somit die kleinsten Bausteine eines Kristalls darstellen.

Im Allgemeinen existieren für Kristalle 230 verschiedene Möglichkeiten, die erlaubten Symmetrieelemente zu einem raumfüllenden Gitter zu kombinieren. Auf diese Weise ergeben sich ebenso viele Raumgruppen, die in die sieben in *Tab. 2.2* gezeigten Kristallsysteme eingeteilt werden. Auf Grund der chiralen Natur ihrer Bausteine sind für Proteinkristalle nur die 65 Raumgruppen ohne Spiegelebenen und Inversionszentren zulässig.

| Kristallsystem | Minimales Symmetrieelement              | Anforderungen an die Zellgeometrie                             |
|----------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Triklin        | keines                                  | keine                                                          |
| Monoklin       | eine 2-zählige Drehachse                | $\alpha=\gamma=90^\circ$                                       |
| Orthorhombisch | drei rechtwinklige 2-zählige Drehachsen | $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$                                 |
| Trigonal       | eine 3-zählige Drehachse                | $\alpha=\gamma=90^\circ$ $\beta=120^\circ$ $\vec{a} = \vec{b}$ |
| Tetragonal     | eine 4-zählige Drehachse                | $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ $\vec{a} = \vec{b}$             |
| Hexagonal      | eine 6-zählige Drehachse                | $\alpha=\gamma=90^\circ$ $\beta=120^\circ$ $\vec{a} = \vec{b}$ |
| Kubisch        | vier 3-zählige Drehachsen               | $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ $\vec{a} = \vec{b} = \vec{c}$   |

*Tab. 2.2:* Kristallsysteme. Gezeigt sind die sieben Kristallsysteme und ihre minimalen Symmetrieelemente sowie die hieraus sich ergebenden Anforderungen an die Zellgeometrie.

## Elektromagnetische Wellen

Elektromagnetische Wellen bestehen aus einer elektrischen und einer senkrecht zu dieser stehenden magnetischen Komponente. Monochromatische Wellen pflanzen sich im Raum in Form einer Kosinus-Funktion fort. Die elektrische Komponente der Welle ist charakterisiert durch ihre Amplitude  $A$  und ihre Wellenlänge  $\lambda$ , die mit der Frequenz  $\nu$  über die Lichtgeschwindigkeit  $c$  verknüpft ist:

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (2.3)$$

Die elektrische Feldstärke der Welle an einem Ort im Raum wird durch

$$E = A \cos(2\pi\nu t) = A \cos(\omega t) \quad (2.4)$$

beschrieben, wobei  $\omega = 2\pi\nu$  gilt. Eine andere Welle der gleichen Amplitude und Wellenlänge, die relativ zur ersten um eine Strecke  $Z$  verschoben ist, besitzt relativ zur Referenzwelle eine Phasenverschiebung von  $\alpha = 2\pi Z/\lambda$  und ihre elektrische Feldstärke wird durch

$$E = A \cos(\omega t + \alpha) \quad (2.5)$$

beschrieben. Diese Welle kann alternativ zur in Gleichung (2.5) gezeigten Form mit Hilfe von zwei Wellen dargestellt werden:

$$A \cos(\omega t + \alpha) = A \cos(\alpha) \cos(\omega t) + A \sin(\alpha) \cos(\omega t + 90^\circ) \quad (2.6)$$

Die Erste der beiden Wellen hat dabei eine Amplitude von  $A \cos(\alpha)$  und einem Phasenwinkel von  $0^\circ$ , während die zweite Welle eine Amplitude von  $A \sin(\alpha)$  und einen Phasenwinkel von  $90^\circ$  besitzt. Die erste Welle wird als der reale Teil und die zweite Welle als der imaginäre Teil der Gesamtwelle bezeichnet. Diese komplexe Darstellung der Gesamtwelle kann in einem axialen Argand-Diagramm durch einen Vektor  $\vec{A}$ , mit den Projektionen  $A \cos(\alpha)$  auf die reale Achse und  $A \sin(\alpha)$  auf die imaginäre Achse beschrieben werden.

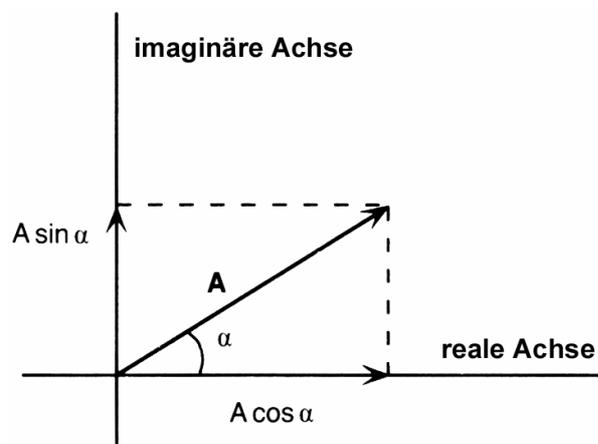


Abb. 2.3: Die reale und imaginäre Komponente des Vektors  $\vec{A}$  in einem axialen Argand-Diagramm (modifiziert nach (Drenth, 1999)).

Der Vorteil der Darstellung von Wellen gleicher Frequenz als Vektoren in einem Argand-Diagramm liegt in der Tatsache, dass sich auf diese Weise ihre Addition stark vereinfacht.

Die Summe einer Vielzahl von Wellen kann mit Hilfe dieser Darstellung durch eine Addition der sie repräsentierenden Vektoren erreicht werden.

Die durch einen Vektor in einem Argand-Diagramm beschriebene Welle kann mathematisch in der komplexen Form  $A \cos(\alpha) + i A \sin(\alpha)$  beschrieben werden. Die Konstante  $i$  beschreibt in diesem Fall anschaulich betrachtet eine Rotation der entsprechenden Komponente im Argand-Diagramm um  $90^\circ$  entgegen des Uhrzeigersinnes, woraus sich  $i = \sqrt{-1}$  ergibt.

Eine andere mathematische Beschreibung einer Welle liefert die Eulersche Formel:

$$A \cos(\alpha) + i A \sin(\alpha) = A e^{i\alpha} \quad (2.7)$$

### **Streuung von Röntgenstrahlung**

Die Streuung von Röntgenstrahlen an Atomen und Molekülen erfolgt in erster Linie durch die Elektronen in ihren Hüllen. Diese können in erster Näherung als freie Elektronen betrachtet werden. Die Streuung von Röntgenstrahlung an freien Elektronen kann nach der klassischen elektromagnetischen Theorie mit der wechselnden Beschleunigung des Elektrons durch die elektrische Komponente der Welle erklärt werden, auf Grund welcher das geladene Elektron seinerseits eine elektromagnetische Welle aussendet. Der Streuungsvorgang kann folglich als eine Absorption und Re-emission von Strahlung betrachtet werden, wobei ein unidirektionaler Röntgenstrahl in alle Richtungen gleichmäßig gestreut wird. Bei der Streuung von kontinuierlicher monochromatischer Röntgenstrahlung wird das Elektron in eine harmonische Schwingung versetzt, wodurch die einfallende und die gestreute Strahlung die gleiche Wellenlänge besitzen. In diesem Fall besteht zwischen der einfallenden und der gestreuten Strahlung eine feste Phasenbeziehung und die Streuung wird als kohärent bezeichnet. Für ein freies Elektron ergibt sich für die gestreute Strahlung eine Phasenverschiebung von  $\pi$  in Bezug auf die einfallende Strahlung.

In der Röntgenstrukturanalyse wird in der Regel monochromatische Strahlung verwendet, weshalb in den folgenden Abschnitten, sofern nicht anders angegeben, lediglich der Spezialfall monochromatischer Strahlung betrachtet wird.

### **Streuung an einem zwei Elektronen System**

Die der Röntgenstrukturanalyse zugrunde liegenden Streuungsvorgänge werden zuerst an dem einfachen, in *Abb. 2.4* gezeigten, System aus zwei Elektronen beschrieben. Das System besteht aus dem Elektron  $e_1$  und dem Elektron  $e_2$ , das eine Position  $\vec{r}$  relativ zu  $e_1$  besitzt. Die durch den Wellenvektor  $\vec{s}_0$  beschriebenen einfallenden Röntgenstrahlen werden von den Elektronen in Richtung des Wellenvektors  $\vec{s}$  gestreut.

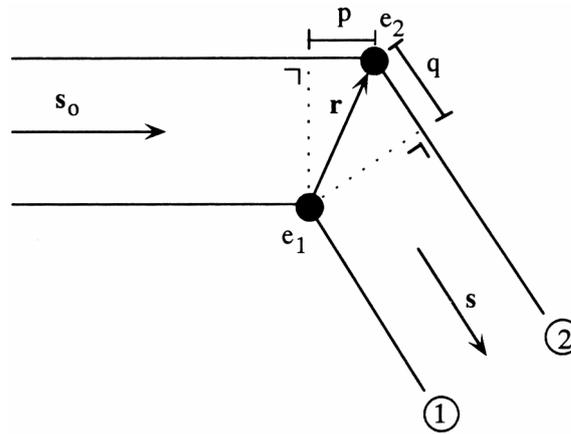


Abb. 2.4: Die Streuung von Röntgenstrahlen an einem System aus zwei Elektronen  $e_1$  und  $e_2$  (modifiziert nach (Drenth, 1999)).

Dabei ergibt sich auf Grund der Wegdifferenz  $Z = p + q$  der beiden Strahlengänge eine Phasenverschiebung von

$$\alpha = 2\pi \frac{Z}{\lambda} = -\frac{2\pi\lambda(\vec{s}_0 - \vec{s}) \cdot \vec{r}}{\lambda} = 2\pi(\vec{s} - \vec{s}_0) \cdot \vec{r} = 2\pi \vec{r} \cdot \vec{S} \quad (2.8)$$

der Welle 2 relativ zur Welle 1, wobei  $\vec{S} = \vec{s} - \vec{s}_0$  ist. Eine andere Betrachtungsweise dieses Streuvorgangs ist die in Abb. 2.5 gezeigte Reflexion der einfallenden Röntgenstrahlen an einer zu  $\vec{S}$  rechtwinkligen imaginären Ebene.

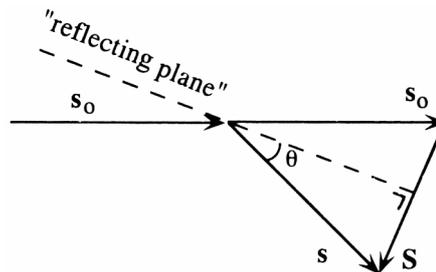


Abb. 2.5: Der Streuvorgang der einfallenden Röntgenstrahlung  $\vec{s}_0$  kann als eine Reflexion der Strahlung an einer imaginären Ebene betrachtet werden (modifiziert nach (Drenth, 1999)).

Die aus dem beschriebenen Streuvorgang resultierende Welle T ergibt sich aus einer Addition der Wellen 1 und 2, was in Abb. 2.6 in Form eines Argand-Diagramms gezeigt ist.

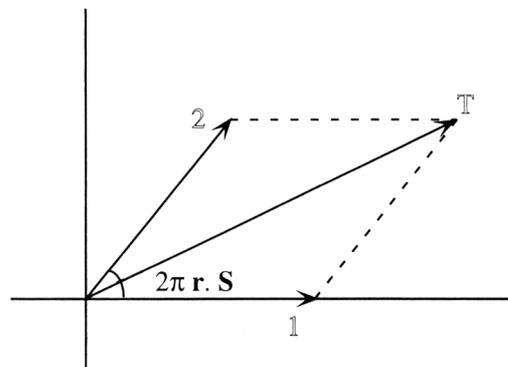
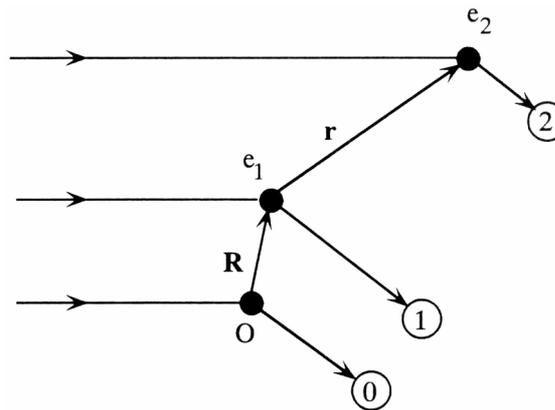


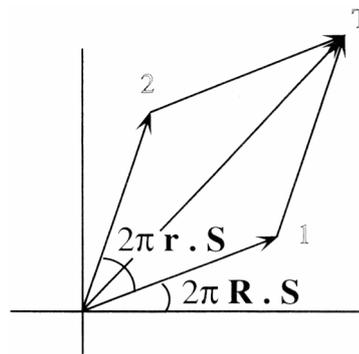
Abb. 2.6: Die Vektoraddition der gestreuten Wellen 1 und 2 zur resultierenden Welle T in einem Argand-Diagramm für ein System aus zwei Elektronen mit dem Ursprung im Elektron  $e_1$  (modifiziert nach (Drenth, 1999)).

Als nächstes wird die Streuung von Röntgenstrahlen an dem in *Abb. 2.7* gezeigten System aus zwei Elektronen mit dem Ursprung im Punkt 0 betrachtet.



*Abb. 2.7:* Die Streuung von Röntgenstrahlen an einem System aus zwei Elektronen  $e_1$  und  $e_2$  mit dem Ursprung des Systems im Punkt 0 (modifiziert nach (Drenth, 1999)).

In diesem System besitzt das Elektron  $e_1$  im Unterschied zu dem in *Abb. 2.4* gezeigten Fall eine Position  $\vec{R}$  relativ zum Ursprung des Systems. Für die gebeugte Welle 1 ergibt sich damit analog zu Gleichung (2.8) eine Phasenverschiebung von  $2\pi \vec{R} \cdot \vec{S}$  relativ zur Welle 0. Die Welle 2 besitzt entsprechend eine Phasenverschiebung von  $2\pi (\vec{r} + \vec{R}) \cdot \vec{S}$  relativ zur Welle 0. Die aus diesem Streuvorgang resultierende Welle ergibt sich durch die in *Abb. 2.8* gezeigte Addition der beiden Wellen mit Hilfe eines Argand-Diagramms.



*Abb. 2.8:* Die Vektoraddition der gestreuten Wellen 1 und 2 zur resultierenden Welle T in einem Argand-Diagramm für ein System aus zwei Elektronen mit dem Ursprung im Punkt 0 (modifiziert nach (Drenth, 1999)).

Der Vergleich der für die Streuung an den beiden betrachteten Systemen aus zwei Elektronen erhaltenen Wellen zeigt, dass eine Verschiebung des Ursprungs keinen Einfluss auf die Amplitude der resultierenden Welle hat, jedoch zu einer Veränderung aller Phasenwinkel um  $2\pi \vec{R} \cdot \vec{S}$  führt.

### Streuung an einem Atom

Die Streuung von Röntgenstrahlen durch Atome beruht weitgehend auf ihren Elektronenhüllen, wobei die Streueigenschaften von der Zahl und den Positionen der Elektronen abhängen. Die Verteilung der Elektronen innerhalb eines Atoms wird durch die Elektronendichte  $\rho(\vec{r})$  beschrieben, wobei der Ursprung des Systems in den Atomkern gelegt wird. Die Verteilung der Elektronendichte in Bezug auf den Kern wird dabei normalerweise als kugelsymmetrisch angenommen weshalb die Streuung an einem Atom eine reale Welle liefert.

Die Streuungseigenschaften eines Atoms werden durch seinen atomaren Streuungsfaktor (engl. „atomic scattering factor“)  $f$  beschrieben:

$$f = \int_{\vec{r}} \rho(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}} d\vec{r} \quad (2.9)$$

Auf Grund der Kugelsymmetrie der Elektronenwolke ist der atomare Streuungsfaktor unabhängig von der Orientierung des Atoms in Bezug auf den Vektor  $\vec{S}$ . Der atomare Streuungsfaktor hängt jedoch vom Betrag von  $|\vec{S}|$  ab:

$$|\vec{S}| = \frac{2 \sin(\theta)}{\lambda} \quad (2.10)$$

Die Werte des atomaren Streuungsfaktors sind für alle Atome in Abhängigkeit von  $|\vec{S}|$  in Form von Tabellen in den „International Tables of X-ray Crystallography“ aufgelistet.

### **Streuung an einer Einheitszelle**

Eine Einheitszelle enthält  $n$  Atome an den Positionen  $\vec{r}_j$  bezogen auf den Ursprung des Systems, wobei jedes dieser Atome die Röntgenstrahlung entsprechend seines atomaren Streuungsfaktors mit seinem Kern als Ursprung streut. Die Verschiebung dieser Referenzpunkte in den Ursprung der Einheitszelle führt zu einer Änderung der Phasenwinkel um  $2\pi \vec{r}_j \cdot \vec{S}$ . Die Streuung der gesamten Einheitszelle wird durch die Addition der Beiträge aller Atome bestimmt und kann nach Gleichung (2.11) berechnet werden. Die resultierende Größe wird als Strukturfaktor bezeichnet, da sie von der Anordnung aller Atome in der Einheitszelle abhängt.

$$\vec{F}(\vec{S}) = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{S}} \quad (2.11)$$

### **Beugung an einem eindimensionalen Gitter**

An einem regelmäßigen Gitter von Streuzentren wird die einfallende Strahlung von jedem der Zentren gleichmäßig in alle Richtungen gestreut. Dieses führt bei einer großen Zahl an Streuzentren dazu, dass sich die meisten der gestreuten Wellen gegenseitig auslöschen. Lediglich unter bestimmten Bedingungen verstärken sich die einzelnen gestreuten Wellen. Die Bedingungen für diese konstruktive Interferenz der gestreuten Wellen sollen im Folgenden mit Hilfe des in *Abb. 2.9* gezeigten eindimensionalen Gitters von Streuzentren hergeleitet werden. Die Streuzentren besitzen dabei untereinander einen Abstand  $a$ . Weiterhin schließt das eindimensionale Gitter von Streuzentren mit der einfallenden bzw. der gebeugten Strahlung der Wellenlänge  $\lambda$  einen Winkel von  $\psi_{a,0}$  bzw.  $\psi_a$  ein. Die Voraussetzung für das Auftreten einer als Beugung bezeichneten positiven Interferenz zwischen den einzelnen gestreuten Wellen ist, dass der Wegunterschied der Wellen einem vielfachen ihrer Wellenlänge entspricht. Dieses ist im hier betrachteten eindimensionalen Fall gegeben, wenn  $CB - AD = h\lambda$  gilt, wobei  $h$  eine ganze Zahl darstellt.

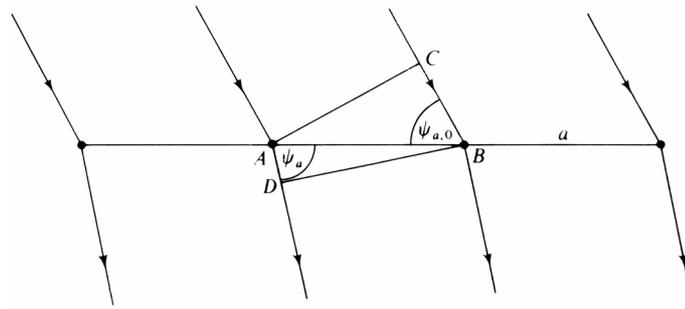


Abb. 2.9: Die Beugung von Röntgenstrahlen an einem eindimensionalen Gitter von Streuzentren. Das eindimensionale Gitter von Streuzentren und die einfallende bzw. die gebeugte Strahlung schließen dabei einen Winkel von  $\psi_{a,0}$  bzw.  $\psi_a$  ein.

Eine andere Form dieses zu beschreiben ist:

$$a \left( \cos(\psi_a) - \cos(\psi_{a,0}) \right) = h \lambda \quad (2.12)$$

Im Zuge der Beugung an einem eindimensionalen Gitter liegen die einfallende Röntgenstrahlung, das Gitter und die gestreute Strahlung nicht notwendigerweise in einer Ebene. Aus diesem Grund liegen die Winkel  $\psi_a$ , unter denen eine positive Interferenz auftritt für einen bestimmten Winkel  $\psi_{a,0}$  und eine bestimmte ganze Zahl  $h$ , wie Abb. 2.10 zeigt, auf einer Kugeloberfläche.

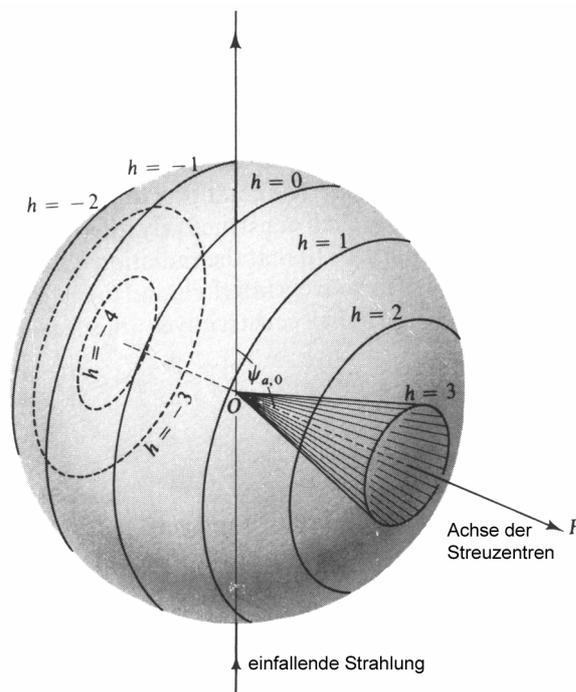


Abb. 2.10: Die zulässigen Winkel für die Beugung an einem eindimensionalen Gitter von Streuzentren liegen bei einem festen Einfallswinkel für die ganzen Zahlen  $h$  auf Kugeloberflächen, die durch ihren Schnittpunkt mit einer Kugeloberfläche angedeutet sind (modifiziert nach (Woolfson, 1997)).

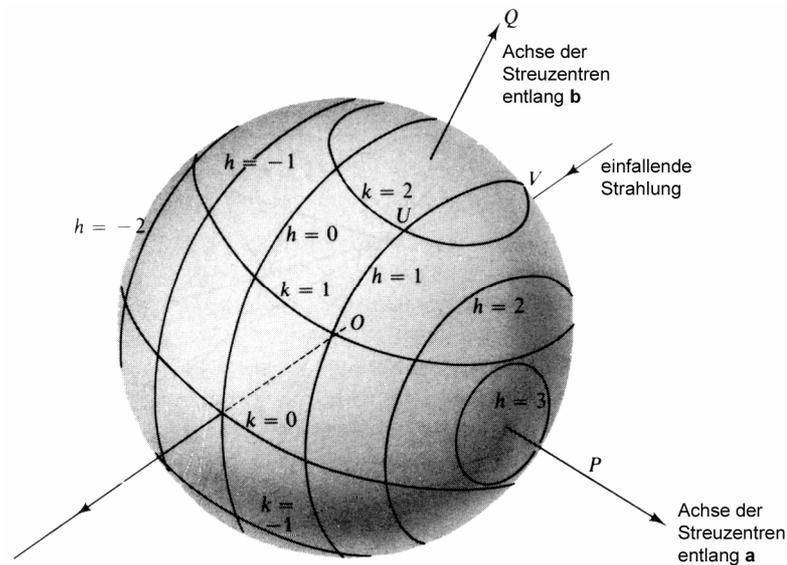
### Beugung an einem zweidimensionalen Gitter

An einem zweidimensionalen Gitter von Streuzentren, deren Abstände entlang der beiden Achsen durch die Vektoren  $\vec{a}$  und  $\vec{b}$  beschrieben werden, findet eine positive Interferenz statt, falls erstens die an den Streuzentren mit dem Abstand  $\vec{a}$  und zweitens die an den Streuzentren mit dem Abstand  $\vec{b}$  gestreuten Wellen eine positive Interferenz zeigen. Die Wellen,

die die erste Bedingung erfüllen, werden dabei von Gleichung (2.12) beschrieben. Für die Wellen, die die zweite Bedingung erfüllen, ergibt sich ein analoger Ausdruck. Aus diesen Überlegungen ergibt sich, dass eine konstruktive Interferenz der an einem zweidimensionalen Gitter gestreuten Wellen lediglich bei Erfüllung von

$$\begin{aligned} a(\cos(\psi_a) - \cos(\psi_{a,0})) &= h\lambda \\ b(\cos(\psi_b) - \cos(\psi_{b,0})) &= k\lambda \end{aligned} \quad (2.13)$$

stattfindet. Analog zum eindimensionalen Gitter definieren die Gleichungen (2.13) bei festen Einfallswinkeln  $\psi_{a,0}$  und  $\psi_{b,0}$  Familien von Kegeloberflächen entlang der Vektoren  $\vec{a}$  und  $\vec{b}$  des Gitters, die in *Abb. 2.11* dargestellt sind. Eine positive Interferenz der gestreuten Wellen findet dabei anschaulich betrachtet nur an den Schnittlinien der beiden Familien von Kegeloberflächen statt.



*Abb. 2.11:* Die zulässigen Winkel für die Beugung an einem zweidimensionalen Gitter von Streuzentren liegen bei festen Einfallswinkeln für die ganzen Zahlen  $h$  und  $k$  an den Schnittpunkten der beiden Familien von Kegeloberflächen, die durch ihren Schnittpunkt mit einer Kugeloberfläche angedeutet sind (modifiziert nach (Woolfson, 1997)).

### Beugung an einem dreidimensionalen Gitter

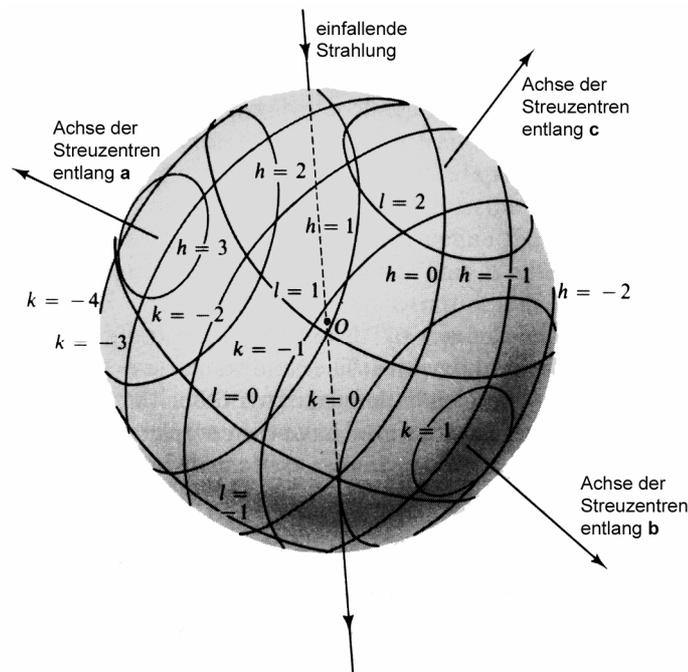
An einem dreidimensionalen Gitter von Streuzentren, deren Abstände entlang der drei Achsen durch die Vektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  definiert sind, findet eine konstruktive Interferenz der gestreuten Wellen in Weiterführung der in den vorherigen Abschnitten entwickelten Konzepte nur bei Erfüllung von

$$\begin{aligned} a(\cos(\psi_a) - \cos(\psi_{a,0})) &= h\lambda \\ b(\cos(\psi_b) - \cos(\psi_{b,0})) &= k\lambda \\ c(\cos(\psi_c) - \cos(\psi_{c,0})) &= l\lambda \end{aligned} \quad (2.14)$$

statt. Die Gleichungen (2.14) werden dabei als Laue-Gleichungen bezeichnet, wobei  $h$ ,  $k$  und  $l$  ganze Zahlen sind. Eine äquivalente Form die Laue-Gleichungen darzustellen ist:

$$\begin{aligned}
 \vec{a} \cdot \vec{S} &= h \\
 \vec{b} \cdot \vec{S} &= k \\
 \vec{c} \cdot \vec{S} &= l
 \end{aligned}
 \tag{2.15}$$

Anschaulich betrachtet definieren die drei Laue-Gleichungen bei festen Einfallswinkeln  $\psi_{a,0}$ ,  $\psi_{b,0}$  und  $\psi_{c,0}$  drei Familien von Kegeloberflächen entlang der drei Vektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$ , die in *Abb. 2.12* für einen typischen Fall dargestellt sind. Eine positive Interferenz der gestreuten Wellen findet dabei auf den Schnittlinien der drei Familien von Kegeloberflächen statt. Die *Abb. 2.12* zeigt weiterhin eine besondere Eigenschaft der Beugung an einem dreidimensionalen Gitter, denn abgesehen von  $h=0$ ,  $k=0$  und  $l=0$  existieren im Allgemeinen keine Schnittlinien der drei Familien von Kegeloberflächen. Aus dieser Tatsache folgt, dass unter den gewählten Einfallswinkeln keine Beugung von Röntgenstrahlen stattfindet, was bei einer willkürlichen Wahl der Einfallswinkel der Normalfall sein wird.



*Abb. 2.12:* Die zulässigen Winkel für die Beugung an einem dreidimensionalen Gitter von Streuzentren liegen bei festen Einfallswinkeln für die ganzen Zahlen  $h$ ,  $k$  und  $l$  an den Schnittpunkten der drei Familien von Kegeloberflächen, die durch ihren Schnittpunkt mit einer Kugeloberfläche angedeutet sind (modifiziert nach (Woolfson, 1997)).

### Das reziproke Gitter

Basierend auf den Vektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  des dreidimensionalen Gitters kann ein neuer Vektor  $\vec{a}^*$  definiert werden, der zu der von  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  aufgespannten Ebene senkrecht steht und die folgenden Eigenschaften besitzt:

$$\vec{a}^* \cdot \vec{a} = 1 \text{ und } \vec{a}^* \cdot \vec{b} = \vec{a}^* \cdot \vec{c} = 0$$

Analog zum Vektor  $\vec{a}^*$  können die Vektoren  $\vec{b}^*$  und  $\vec{c}^*$  definiert werden, für die die folgenden Zusammenhänge gelten:

$$\begin{aligned}
 \vec{a} \cdot \vec{a}^* &= 1 & \vec{a} \cdot \vec{b}^* &= 0 & \vec{a} \cdot \vec{c}^* &= 0 \\
 \vec{b} \cdot \vec{a}^* &= 0 & \vec{b} \cdot \vec{b}^* &= 1 & \vec{b} \cdot \vec{c}^* &= 0 \\
 \vec{c} \cdot \vec{a}^* &= 0 & \vec{c} \cdot \vec{b}^* &= 0 & \vec{c} \cdot \vec{c}^* &= 1
 \end{aligned}
 \tag{2.16}$$

Die Vektoren  $\vec{a}^*$ ,  $\vec{b}^*$  und  $\vec{c}^*$  definieren dabei analog zu den Vektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  ein Gitter, welches als reziprokes Gitter bezeichnet wird. Die Gitterpunkte dieses reziproken Gitters werden durch die reziproken Gittervektoren  $\vec{S} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$  beschrieben, wobei  $h$ ,  $k$  und  $l$  ganze Zahlen darstellen. Diese reziproken Gittervektoren sind, wie unter Verwendung von Gleichung (2.16) gezeigt werden kann, die einzigen Lösungen für die Laue-Gleichungen:

$$\begin{aligned}
 \vec{a} \cdot \vec{S} &= (h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*) \cdot \vec{a} = h \\
 \vec{b} \cdot \vec{S} &= (h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*) \cdot \vec{b} = k \\
 \vec{c} \cdot \vec{S} &= (h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*) \cdot \vec{c} = l
 \end{aligned}
 \tag{2.17}$$

Das reziproke Gitter beschreibt somit das Beugungsbild eines dreidimensionalen Gitters von Streuzentren, wobei eine positive Interferenz und somit eine von null verschiedene Intensität der gestreuten Wellen nur an den Gitterpunkten des reziproken Gitters möglich ist. Mathematisch gesehen beschreibt das reziproke Gitter die Fourier-Transformation der räumlichen Verteilung der sich periodisch wiederholenden Streuzentren.

### Das Bragg'sche-Gesetz

Einen anderen Ansatz zur Beschreibung der Beugung von Röntgenstrahlen an einem dreidimensionalen Gitter von Streuzentren liefert das Bragg'sche-Gesetz. Dieser Ansatz ist mathematisch gesehen ebenso in der Lage die Beugung von Röntgenstrahlen zu erklären, wenn auch die gemachten physikalischen Annahmen nicht zutreffend sind.

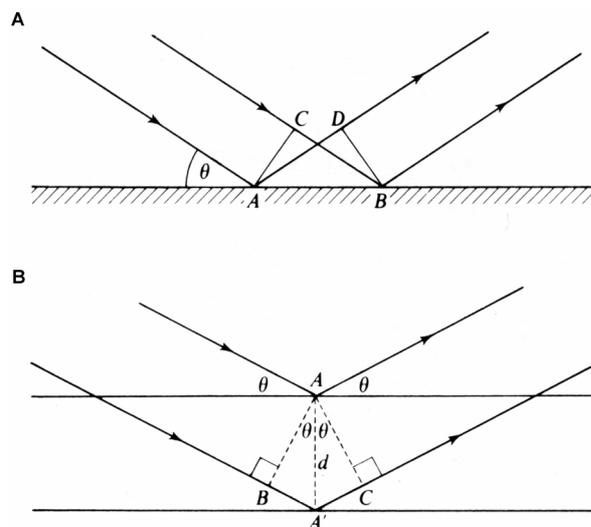


Abb. 2.13: Die Reflexion von parallelen Strahlen an (A) unterschiedlichen Punkten auf einer Ebene und (B) zwei Punkten auf benachbarten teilweise reflektierenden Ebenen (modifiziert nach (Woolfson, 1997)).

In der Herleitung des Bragg'schen-Gesetzes wird angenommen, dass die Beugung der Röntgenstrahlen am Gitter auf einer Reflexion der Strahlen an einer Schar von parallelen Ebenen gleichen Abstands beruht, die alle Streuzentren enthalten. Die Voraussetzung für eine Re-

flektion ist dabei eine konstruktive Interferenz der an den parallelen Ebenen reflektierten Wellen. Diese Voraussetzung ist für zwei beliebige Punkte  $A$  und  $B$  in einer Ebene, wie *Abb. 2.13A* zeigt, für alle Einfallswinkel  $\theta$  gegeben, da für ihren Wegunterschied  $CB - AD = 0$  gilt. Im Unterschied dazu erfolgt eine konstruktive Interferenz der an zwei Punkten auf parallelen, teilweise reflektierenden Ebenen mit dem Abstand  $d$  gestreuten Wellen für den Fall, dass der Wegunterschied zwischen den beiden Punkten  $A$  und  $A'$  einem ganzzahligen Vielfachen  $n$  der Wellenlänge  $\lambda$  entspricht.

$$BA' + A'C = n\lambda \quad (2.18)$$

Mit Hilfe von *Abb. 2.13B* ergibt sich durch geometrische Überlegungen:

$$BA' = A'C = d \sin(\theta) \quad (2.19)$$

Aus einer Kombination der Gleichungen (2.18) und (2.19) wird das Bragg'sche-Gesetz erhalten, das die Einfallswinkel  $\theta$  beschreibt unter denen bei einer Wellenlänge  $\lambda$  und einem Ebenenabstand  $d_{hkl}$  eine positive Interferenz der reflektierten Wellen beobachtet werden kann.

$$2d_{hkl} \sin(\theta) = n\lambda \quad (2.20)$$

Eine bestimmte Schar von Ebenen wird dabei durch den Schnittpunkt der Ebene, die dem Ursprung am nächsten ist, mit den Achsen der Einheitszelle bei  $\bar{a}/h$ ,  $\bar{b}/k$  und  $\bar{c}/l$  durch die ganzen Zahlen  $h$ ,  $k$  und  $l$  beschrieben. Das Bragg'sche-Gesetz kann alternativ zu der in Gleichung (2.20) gezeigten Form durch

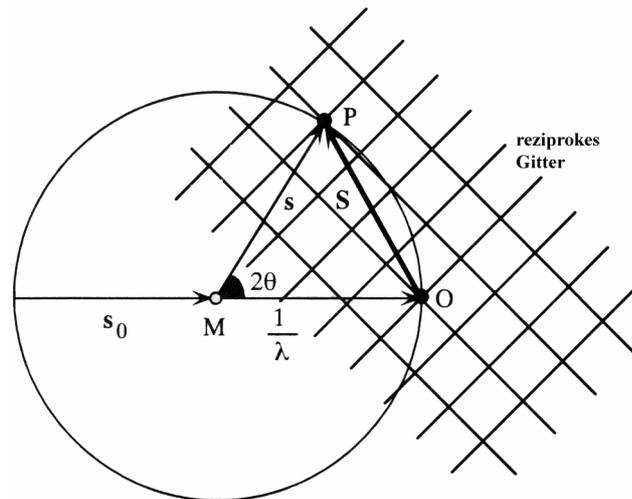
$$2d_{hkl} \sin(\theta) = \lambda \quad (2.21)$$

beschrieben werden, wobei in dieser Form ein gebeugter Röntgenstrahl  $n$ -ter Ordnung an der Ebene  $(hkl)$  wie ein Reflex 1. Ordnung an der fiktiven Ebene  $(nh \ nk \ nl)$  behandelt wird. Dieses ist zulässig, da der Ebenenabstand der fiktiven Ebene  $(nh \ nk \ nl)$  dem  $1/n$  fachen Abstand der realen Ebene entspricht.

Das die Beugung von Röntgenstrahlung an einem dreidimensionalen Gitter von Streuzentren beschreibende reziproke Gitter wird mit Hilfe des Bragg'schen-Gesetztes erhalten, indem zuerst die entsprechende Ebenenschar  $(hkl)$  eingezeichnet wird. Mit Hilfe dieser Ebenenschar wird die senkrecht auf diesen Ebenen stehende Normale ausgehend vom Ursprung gebildet und entlang dieser Normalen ausgehend vom Ursprung die Strecke  $d_{hkl}^{-1}$  eingezeichnet, deren Endpunkt dem aus der Reflektion an der Ebenenschar resultierenden gebeugten Röntgenstrahl entspricht. Das gesamte reziproke Gitter wird auf diese Weise erhalten, indem die Konstruktion für alle weiteren Ebenenscharen durchgeführt wird.

## Die Ewald-Kugel

Die Bedingungen unter denen ein bestimmter gebeugter Röntgenstrahl beobachtet werden kann und die Richtung des resultierenden Strahls lassen sich in eleganter Weise mit Hilfe der in *Abb. 2.14* gezeigten Ewald-Kugel bestimmen.



*Abb. 2.14:* Die Ewald-Kugel ist eine Konstruktion zur Bestimmung derjenigen Bedingungen, unter denen ein bestimmter gebeugter Röntgenstrahl beobachtet werden kann. Die Details zu ihrer Konstruktion finden sich im Text (modifiziert nach (Drenth, 1999)).

Für ihre Konstruktion wird der einfallende Röntgenstrahl  $\vec{s}_0$ , dessen Länge  $\lambda^{-1}$  ist, auf den Ursprung  $O$  des reziproken Gitters ausgerichtet. Im nächsten Schritt wird eine Kugel mit dem Ursprung  $O$  des reziproken Gitters auf ihrer Oberfläche konstruiert, deren Mittelpunkt  $M$  auf  $\vec{s}_0$  liegt und die einen Radius von  $\lambda^{-1}$  besitzt. Diese Kugel wird als Ewald-Kugel bezeichnet. Ein bestimmter Gitterpunkt des reziproken Gitters, der durch den reziproken Gittervektor  $\vec{S}$  definiert wird, kann in dieser Konstruktion einen gebeugten Röntgenstrahl  $\vec{s}$  erzeugen, wenn er auf der Oberfläche der Ewald-Kugel liegt.

## Der Strukturfaktor

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Gittern, die nur Streuzentren im Ursprung der von den Vektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  aufgespannten Einheitszelle besitzen, enthält die Einheitszelle eines Proteinkristalls im allgemeinen eine Vielzahl von Atomen. Bei Betrachtung nur eines dieser Atome zeigt sich, dass das Atom ein dreidimensionales Gitter bildet, wodurch eine konstruktive Interferenz nur unter den von den Laue-Gleichungen beschriebenen Bedingungen möglich ist. Diese Überlegung trifft in gleicher Weise auf alle anderen Atome der Einheitszelle zu.

Für einen realen Kristall folgt deshalb, dass eine konstruktive Interferenz und somit das Auftreten einer gebeugten Welle nur unter den von den Laue-Gleichungen beschriebenen Bedingungen möglich ist. Die unter diesen Bedingungen entstehende gebeugte Welle ist das Resultat einer Addition aller Wellen, die von den einzelnen Atomen gestreut werden. Für eine Einheitszelle mit  $n$  Atomen ergibt sich mit einem Streuvektor  $\vec{S}$ , der eine Lösung der Laue-Gleichungen darstellt und durch die ganzen Zahlen  $(hkl)$  definiert ist, für die resultierende gebeugte Welle analog zu Gleichung (2.11) die folgende Gleichung:

$$\vec{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{S}} \quad (2.22)$$

Die Größe  $\vec{F}_{hkl}$  in dieser Gleichung wird als Strukturfaktor bezeichnet, da sie von der Anordnung aller Atome in einer Einheitszelle abhängt. Die ganzen Zahlen  $h$ ,  $k$  und  $l$  werden dabei als Indizes der Reflexion oder Millersche Indizes bezeichnet.

Die Position  $P$  eines Atoms in der Einheitszelle kann auf Basis der Vektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  mit Hilfe der gebrochenen Zahlen  $x$ ,  $y$  und  $z$ , welche Werte zwischen 0 und 1 annehmen können, durch den folgenden Vektor beschrieben werden:

$$\vec{r} = x\vec{a} + y\vec{b} + z\vec{c} \quad (2.23)$$

Aus dieser Gleichung und dem für den reziproken Gittervektor  $\vec{S}$  erhaltenen Ausdruck folgt mit Gleichung (2.22):

$$\vec{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i (x_j \vec{a} + y_j \vec{b} + z_j \vec{c}) \cdot (h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*)} \quad (2.24)$$

Mit Hilfe der in Gleichung (2.16) beschriebenen Zusammenhänge ergibt sich für den Strukturfaktor:

$$\vec{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (2.25)$$

### Berechnung der Elektronendichte

Der Strukturfaktor ist, wie die vorhergehenden Abschnitte zeigen, eine Funktion der Elektronendichteverteilung in der Einheitszelle. Aus diesem Grund kann der Strukturfaktor anstelle einer Summierung über alle Atome der Einheitszelle durch eine Integration der Elektronendichteverteilung in der Einheitszelle bestimmt werden, wobei  $V$  das Volumen der Einheitszelle ist.

$$\vec{F}_{hkl} = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(xyz) e^{2\pi i (hx + ky + lz)} dx dy dz \quad (2.26)$$

Der Strukturfaktor  $\vec{F}_{hkl}$  stellt dabei die Fourier-Transformation der Elektronendichte  $\rho(xyz)$  dar. Aus diesem Grund kann die Elektronendichte  $\rho(xyz)$  aus dem Strukturfaktor  $\vec{F}_{hkl}$  durch eine inverse Fourier-Transformation erhalten werden. Ein Ersetzen der Integration durch eine Summierung im Ergebnis dieser Transformation liefert für die Elektronendichte  $\rho(xyz)$ :

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F_{hkl} e^{-2\pi i (hx + ky + lz)} \quad (2.27)$$

Das Ersetzen der Integration durch eine Summierung ist in diesem Fall zulässig, da der Strukturfaktor  $\vec{F}_{hkl}$  nach den Laue-Gleichungen lediglich an den Gitterpunkten  $(hkl)$  des reziproken Gitters einen von Null verschiedenen Wert besitzt.

Der Strukturfaktor  $\vec{F}_{hkl}$  kann, wie alle komplexen Größen, in Betrag und Phase zerlegt werden:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha(hkl)} \quad (2.28)$$

Daraus ergibt sich für die in Gleichung (2.27) beschriebene Elektronendichte  $\rho(xyz)$  die folgende Gleichung:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |F_{hkl}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha(hkl)} \quad (2.29)$$

### Das Phasenproblem

Die Elektronendichte  $\rho(xyz)$  an einer Position  $(xyz)$  der Einheitszelle kann durch die in Gleichung (2.29) gezeigte Fourier-Reihe mit Hilfe der Amplituden der Strukturfaktoren  $|\vec{F}_{hkl}|$  und ihrer Phasenwinkel  $\alpha(hkl)$  bestimmt werden. Die zu diesem Zweck benötigten Amplituden der Strukturfaktoren  $|\vec{F}_{hkl}|$  können aus den Intensitäten  $I(hkl)$  der entsprechenden Reflexe im Beugungsbild nach der Anwendung einiger Korrekturfaktoren durch die Beziehung

$$I(hkl) = |F(hkl)|^2 \quad (2.30)$$

bestimmt werden. Im Gegensatz dazu können die Phasenwinkel der Strukturfaktoren nicht direkt aus dem Beugungsbild ermittelt werden, was als Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse bezeichnet wird. Zur Bestimmung der fehlenden Phaseninformationen stehen bei Proteinstrukturen die folgenden Techniken zur Verfügung:

- „Multiple Isomorphous Replacement“ (MIR)
- „Multiple wavelength Anomalous Dispersion“ (MAD)
- „Molecular Replacement“ (MR)

Diese Techniken zur Bestimmung der Phaseninformationen und die zu ihrer Anwendung notwendigen Voraussetzungen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Für die Anwendung der beiden erstgenannten Verfahren ist es notwendig, die Position von bestimmten Atomen in der Einheitszelle zu bestimmen. Bei dieser Aufgabe ist die Patterson-Funktion von großem Nutzen; sie wird aus diesem Grund zuerst beschrieben.

### Die Patterson-Funktion

Die Patterson-Funktion  $P(uvw)$  stellt, genau wie die Elektronendichte, eine Fourier-Reihe dar. Im Gegensatz zur Elektronendichte verwendet sie jedoch die Intensitäten der Reflexe  $|\vec{F}_{hkl}|^2$  als Koeffizienten und alle Phasenwinkel sind null. Aus diesem Grund kann sie ohne Vorwissen über die Struktur berechnet werden. Mit den Koordinaten  $u$ ,  $v$  und  $w$  der

Patterson-Zelle, die die gleichen Dimensionen wie die Einheitszelle besitzt, ergibt sich für die Patterson-Funktion die folgende Form:

$$P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |\vec{F}_{hkl}|^2 \cos(2\pi(hu + kv + lw)) \quad (2.31)$$

Die mit Hilfe der Patterson-Funktion berechnete Patterson-Zelle beschreibt die interatomaren Vektoren der Atome in der Einheitszelle ausgehend von einem gemeinsamen Ursprung. Diese physikalische Interpretation der Patterson-Funktion kann mit Hilfe der folgenden Form der Funktion veranschaulicht werden:

$$P(\vec{u}) = \int_{\vec{r}_1} \rho(\vec{r}_1) \times \rho(\vec{r}_1 + \vec{u}) d\vec{r} \quad (2.32)$$

In der gezeigten Form kann die Patterson-Funktion anschaulich als eine Funktion angesehen werden, die durch die Integration von  $\vec{r}_1$  über alle Positionen in der Einheitszelle den Vektor  $\vec{u}$  durch die Einheitszelle bewegt und die Elektronendichte  $\rho$  an jeder Position  $\vec{r}_1$ , dem Anfang von  $\vec{u}$ , mit der Elektronendichte an der Position  $\vec{r}_1 + \vec{u}$ , dem Ende von  $\vec{u}$ , multipliziert. Das Ergebnis dieser Multiplikation hat dabei nur dann einen von null verschiedenen Wert, wenn die Elektronendichte am Anfang und am Ende von  $\vec{u}$  einen von null verschiedenen Wert besitzt. Ein Signal in der Patterson-Zelle an der Position  $\vec{u}$  bedeutet somit, dass in der Einheitszelle an einer beliebigen Position  $(xyz)$  und der Position  $(x+u \ y+v \ z+w)$  oder  $(x-u \ y-v \ z-w)$  Atome lokalisiert sind, wobei die Patterson-Funktion nicht in der Lage ist zwischen den beiden Positionen zu unterscheiden.

Aus den auf diese Weise erhaltenen interatomaren Vektoren können für einfache Strukturen mit wenigen Atomen die Positionen der Atome in der Einheitszelle bestimmt werden.

### „Multiple Isomorphous Replacement“

Die Bestimmung der Phaseninformationen durch MIR basiert auf mindestens drei Kristallen, die sich nur durch das Vorhandensein eines oder mehrerer spezifisch gebundener starker Streuzentren unterscheiden. Bei solchen starken Streuzentren handelt es sich in der Regel um elektronenreiche und somit stark streuende Schwermetalle, die im Weiteren als Schweratome bezeichnet werden. Der in der Regel zuerst erhaltene Kristall ohne gebundene Schweratome wird als nativer Kristall bezeichnet. Im Gegensatz dazu werden Kristalle mit spezifisch gebundenen Schweratomen als Derivate bezeichnet. Die zur Bestimmung der Phaseninformationen notwendige spezifische Integration der Schweratome in den Kristall kann auf zwei Wegen erreicht werden. Erstens durch die Inkubation des Kristalls in der Lösung eines Schweratoms, wobei sich das Schweratom spezifisch an die im Kristall enthaltenen Proteine anlagern kann. Zweitens durch die Kristallisation des Proteins in Gegenwart eines Schweratoms, wobei eine spezifische Integration der Schweratome in den Kristall erreicht werden kann. Für eine erfolgreiche Bestimmung der Phaseninformationen müssen der native Kristall und die verwendeten Schweratomderivate weitgehend isomorph sein. Dieses bedeutet, dass die Kristalle

identische Einheitszellen besitzen und sich in der Zahl und der Lage der in ihnen enthaltenen Atome und Moleküle, bis auf die Schweratome, nicht unterscheiden.

Die auf den beschriebenen Kristallen aufbauende Bestimmung der Phasenwinkel mittels MIR basiert auf der Annahme, dass die Intensitätsunterschiede der Reflexe des nativen Kristalls und seines isomorphen Schweratomderivats nur auf der Anwesenheit eines oder mehrerer Schweratome in letzterem beruhen. Aus dieser Annahme folgt, dass der Strukturfaktor eines Reflexes des Schweratomderivats  $\vec{F}_{PH}$  durch eine Vektoraddition des Strukturfaktors des nativen Kristalls  $\vec{F}_P$  und des Strukturfaktors der Schweratome  $\vec{F}_H$  erhalten werden kann.

$$\vec{F}_{PH} = \vec{F}_P + \vec{F}_H \quad (2.33)$$

Auf Basis dieses Zusammenhangs besteht der erste Schritt zur Bestimmung der Phasenwinkel darin, die Lage der Schweratome in der Einheitszelle zu bestimmen. Zu diesem Zweck werden aus den Reflexen des nativen Kristalls und des Schweratomderivats die Differenzen  $\Delta|\vec{F}|_{iso}$  der Strukturfaktoramplituden berechnet:

$$\Delta|F|_{iso} = \left| \vec{F}_{PH} \right| - \left| \vec{F}_P \right| \quad (2.34)$$

Die unter Verwendung einer Patterson-Funktion mit dem Koeffizienten  $(\Delta|F|_{iso})^2$  erhaltene Differenz-Pattersonkarte beschreibt die interatomaren Vektoren der Schweratome. Aus diesen können für eine kleine Zahl von Schweratomen zwei Sätze von Positionen dieser Atome in der Einheitszelle bestimmt werden, die Spiegelbilder voneinander sind. Auf Grund der Unfähigkeit der Patterson-Funktion zwischen Atomen an den Positionen  $(x + u \ y + v \ z + w)$  und  $(x - u \ y - v \ z - w)$  zu unterscheiden ist es jedoch nicht möglich, den Richtigen der beiden Sätze von Positionen zu bestimmen. Aus diesem Grund wird für die Bestimmung der Phaseninformationen willkürlich einer der beiden Sätze von Positionen gewählt und unter Verwendung von Gleichung (2.25) der Strukturfaktor der Schweratome  $\vec{F}_H$  berechnet. Aus dem berechneten Strukturfaktor der Schweratome  $\vec{F}_H$  und den Amplituden der Strukturfaktoren des nativen Kristalls  $|\vec{F}_P|$  und des Schweratomderivats  $|\vec{F}_{PH}|$  können unter Anwendung von Gleichung (2.33) zwei mögliche Phasenwinkel bestimmt werden. Ihre graphische Bestimmung erfolgt mit Hilfe der in *Abb. 2.15A* für ein Schweratomderivat gezeigten Harker-Konstruktion, zu deren Herstellung zuerst ein Kreis mit dem Radius  $|\vec{F}_P|$  erstellt wird. Anschließend wird ausgehend vom Mittelpunkt dieses Kreises der Vektor  $-\vec{F}_H$  eingezeichnet und an seinem Ende ein zweiter Kreis mit dem Radius  $|\vec{F}_{PH}|$  gezeichnet. Die beiden möglichen Phasenwinkel können aus den Schnittpunkten der beiden Kreise ermittelt werden.

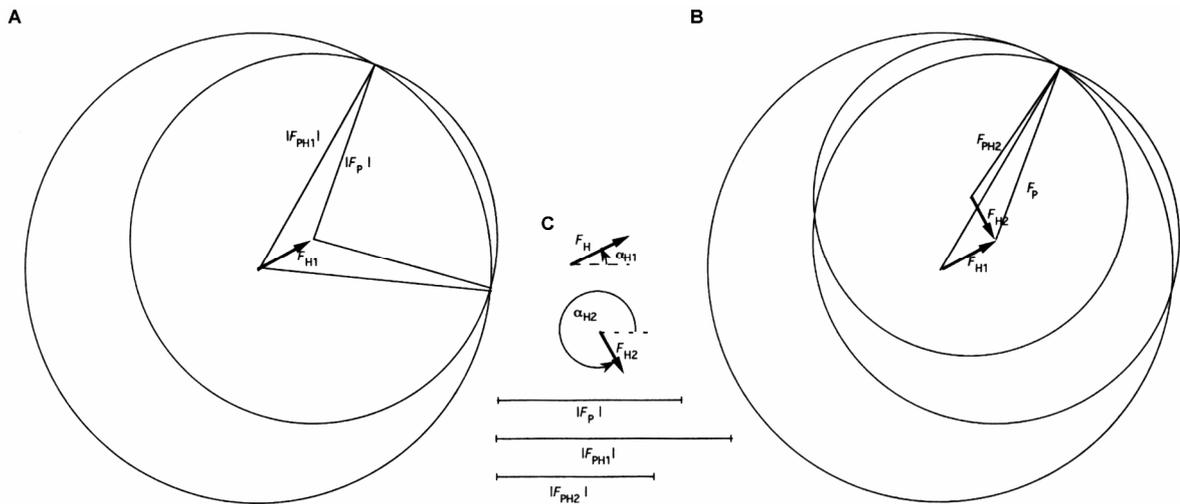


Abb. 2.15: Die graphische Bestimmung der Phasenwinkel der Strukturfaktoren mit Hilfe einer Harker-Konstruktion. Gezeigt ist eine Harker-Konstruktion von (A) einem Schweratomderivat und (B) zwei Schweratomderivaten. In (C) sind die für die Harker-Konstruktion verwendeten bekannten Größen dargestellt. Dieses sind einerseits die Amplituden und die Phasenwinkel der Strukturfaktoren der Schweratome und andererseits die Amplituden der Strukturfaktoren des nativen Kristalls und seiner isomorphen Schweratomderivate (modifiziert nach (Blow, 2002)).

Zur eindeutigen Bestimmung des Phasenwinkels des Strukturfaktors  $\vec{F}_p$  ist jedoch mindestens ein weiteres Schweratomderivat notwendig. Für dieses werden die Positionen der Schweratome in der Einheitszelle bestimmt, wobei ihre Positionen relativ zum Ursprung des ersten Derivats angegeben werden. Dieses erfolgt auf Basis der Symmetrieeigenschaften der Kristalle oder unter Verwendung einer Differenzelektronendichtekarte, die durch die folgende Fourier-Reihe erhalten wird.

$$\Delta\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} (|F_{PH}(hkl)| - |F_P(hkl)|) e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha_p(hkl)} \quad (2.35)$$

Für die Berechnung der Differenzelektronendichtekarte wird der Mittelwert der beiden für das erste Schweratomderivat möglichen Phasenwinkel verwendet. Aus den auf diese Weise bestimmten Positionen der Schweratome werden erneut zwei mögliche Phasenwinkel des Strukturfaktors  $\vec{F}_p$  bestimmt, die Gleichung (2.33) erfüllen. Der Phasenwinkel des Strukturfaktors  $\vec{F}_p$  kann aus den resultierenden Paaren von möglichen Winkeln bestimmt werden, denn nur einer der beiden für das erste Derivat erhaltenen Winkel ist auch eine Lösung für das zweite und jedes weitere Derivat. Dieses verdeutlicht in einer graphischen Form die in Abb. 2.15B gezeigte Harker-Konstruktion für zwei Schweratomderivate, in der nur ein Schnittpunkt aller drei Kreise existiert, an dem Gleichung (2.33) für beide Derivate gleichzeitig erfüllt ist.

Im Anschluss an die Bestimmung der Phasenwinkel der Strukturfaktoren  $\vec{F}_{hkl}$  wird die Elektronendichte berechnet und dann zeigt sich, ob der richtige Satz von Schweratompositionen gewählt wurde. Im Fall der richtigen Wahl der Positionen ergibt sich die Proteinstruktur mit L-Aminosäuren und rechtsgängigen  $\alpha$ -Helices. Im Unterschied dazu wird bei der Wahl der falschen Positionen ihr Spiegelbild mit D-Aminosäuren und linksgängigen  $\alpha$ -Helices re-

sultieren; in diesem Fall wird die Berechnung der Elektronendichte mit den aus dem verbleibenden Satz von Schweratompositionen erhaltenen Phasenwinkeln wiederholt.

### „Multiple wavelength Anomalous Dispersion“

Bei der Beschreibung der Streuung von Röntgenstrahlen an den Atomhüllen werden die für diesen Effekt verantwortlichen Elektronen in erster Näherung als frei betrachtet. Diese Annahme ist nicht mehr zutreffend, wenn sich die Wellenlänge der Röntgenstrahlung einer Absorptionskante nähert, an welcher die Energie der Strahlung das Atom in einen angeregten Zustand versetzen kann. Die in diesem Fall auftretende anomale Streuung zeigt im Vergleich zu freien Elektronen eine von  $\pi$  verschiedene Phasenverschiebung relativ zur einfallenden Strahlung.

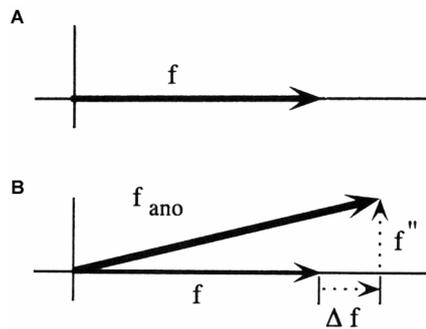


Abb. 2.16: Die atomaren Streufaktoren von (A) einem freien Elektronen und (B) einem gebundenen Elektron. Der anomale Beitrag zum atomaren Streufaktor setzt sich aus einer realen und einer imaginären Komponente zusammen (modifiziert nach (Drenth, 1999)).

Der atomare Streufaktor  $f_{ano}$  eines anomal streuenden Atoms ist in diesem Fall

$$f_{ano} = f + \Delta f + if'' = f' + f'' \quad (2.36)$$

wobei  $\Delta f$  den realen und  $f''$  den imaginären Teil der anomalen Streuung darstellen. Die auf diese Weise veränderten atomaren Streufaktoren verursachen einen Unterschied in der Amplitude und dem Phasenwinkel der – in Abwesenheit von anomaler Streuung bis auf das Vorzeichen des Phasenwinkels – identischen Strukturformeln  $\vec{F}_{PH}(hkl) = \vec{F}(+)$  und  $\vec{F}_{PH}(-h-k-l) = \vec{F}(-)$ , die als Bijvoet- oder Friedel-Paare bezeichnet werden. Der Grund hierfür ist, dass die anomalen Komponenten der Strukturformeln keine komplexen Konjugate voneinander sind.

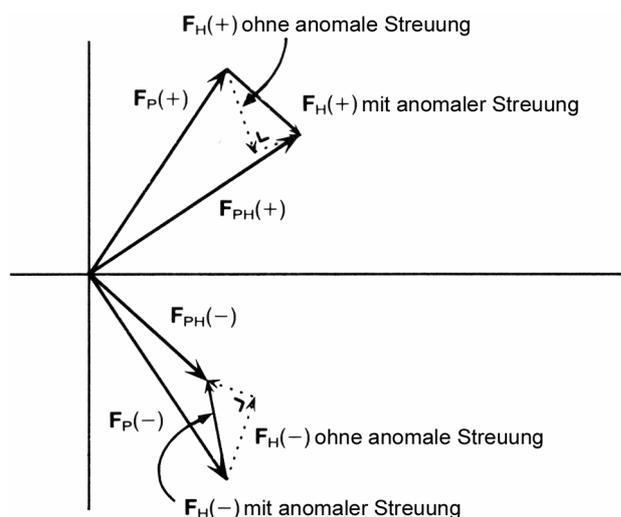


Abb. 2.17: Die Strukturfaktoren eines Bijvoet-Paares mit und ohne Auftreten von anomaler Streuung (modifiziert nach (Drenth, 1999)).

Im Rahmen der MAD (Hendrickson et al., 1990; Hendrickson et al., 1988; Murthy et al., 1988) wird die in Abb. 2.18 am Beispiel der K-Absorptionskante von Selen gezeigte Wellenlängenabhängigkeit der realen  $\Delta f$  und der imaginären  $f''$  Komponente der anomalen Streuung zur Bestimmung der Phasenwinkel der Strukturfaktoren genutzt.

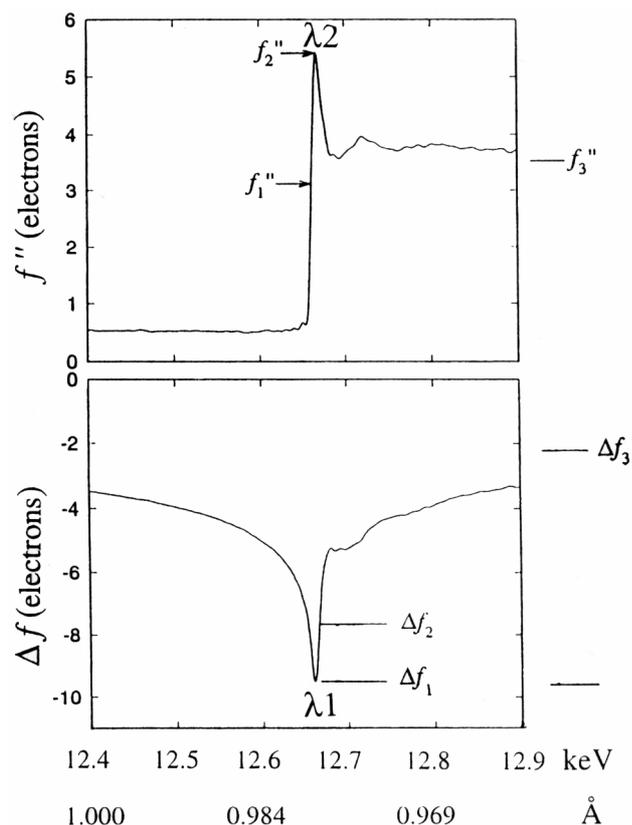


Abb. 2.18: Der Verlauf der realen ( $\Delta f$ ) und der imaginären ( $f''$ ) Komponente der anomalen Streuung an der K-Absorptionskante von Selen in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Das Minimum der realen Komponente entspricht dabei der Wellenlänge  $\lambda_1$ . Das Maximum der imaginären Komponente findet sich im Unterschied dazu bei der Wellenlänge  $\lambda_2$ . Die Wellenlänge  $\lambda_3$  liegt außerhalb des gezeigten Ausschnitts, aus diesem Grund sind die Werte für die reale und die imaginäre Komponente der anomalen Streuung rechts neben dem Diagramm eingezeichnet (modifiziert nach (Drenth, 1999)).

Die Grundvoraussetzung zur Anwendung der MAD ist das Vorhandensein von anomal streuenden Atomen im Kristall, die im zur Messung verwendeten Wellenlängenbereich eine Ab-

sorptionskante besitzen. Am häufigsten wird zu diesem Zweck das Element Selen eingesetzt, das auf biologischem Wege durch Verwendung von Selenomethionin an Stelle von Methionin in das Protein eingebaut werden kann. Alternativ ist jedoch auch die Verwendung von zusätzlichen an das Protein gebundenen oder nativ in diesem vorkommenden Schweratomen möglich.

Im Rahmen der MAD erfolgt die Aufnahme von Beugungsdaten bei den Wellenlängen

$\lambda_1$  (inflection), an der die reale Komponente  $\Delta f$  ihr Minimum besitzt und die imaginäre Komponente  $f''$  einen Wendepunkt hat,

$\lambda_2$  (maximum), an der die imaginäre Komponente  $f''$  ihr Maximum besitzt und der Unterschied der Bijvoet-Paare am größten ist,

$\lambda_3$  (remote), bei der  $\Delta f$  und  $f''$  vernachlässigbar sind.

Die MAD nutzt einerseits die isomorphen oder dispersiven Intensitätsunterschiede der Reflexe zwischen den Wellenlängen  $\lambda_1$  und  $\lambda_3$ , sowie andererseits die anomalen Unterschiede in den Intensitäten der Bijvoet-Paare bei  $\lambda_2$  zur Bestimmung der Phasenwinkel der Struktur-faktoren.

Die Bestimmung eines Paares von möglichen Phasenwinkeln aus den großen – auf der realen Komponente der anomalen Streuung beruhenden – isomorphen oder dispersiven Intensitätsunterschieden der Reflexe zwischen den Wellenlängen  $\lambda_1$  und  $\lambda_3$  erfolgt in einem dem MIR analogen Verfahren. Hierbei werden die für die Wellenlänge  $\lambda_3$  erhaltenen Beugungsdaten als native Daten verwendet und die geringen Anteile der imaginären Komponenten der anomalen Streuung bei diesen Wellenlängen durch eine Mittelung der Intensitäten der Bijvoet-Paare entfernt. Zu diesem Zweck wird mit Hilfe der Patterson-Funktion die Lage der anomal streuenden Atome in der Einheitszelle bestimmt und diese zur Berechnung des Struktur-faktors  $\vec{F}_H$  der anomal streuenden Atome eingesetzt. Zwei mögliche Phasenwinkel werden aus dem berechneten Struktur-faktor  $\vec{F}_H$  der anomal streuenden Atome und den experimentell bestimmten Struktur-faktor-amplituden der Reflexe bei den beiden Wellenlängen  $\lambda_1$  und  $\lambda_3$  mit Hilfe einer Harker-Konstruktion bestimmt.

In einem weiteren Schritt kann aus den auf Grund der großen imaginären Komponente der anomalen Streuung entstehenden Intensitätsunterschieden der Bijvoet-Paare bei der Wellenlänge  $\lambda_2$  ein weiteres Paar von möglichen Phasenwinkeln ermittelt werden. Die Grundlage hierfür ist, dass sich der Struktur-faktor  $\vec{F}_{PH}$  beim Auftreten von anomaler Streuung aus einer nicht anomalen Komponente  $\vec{F}_N$  und einer anomalen Komponente  $\vec{F}_{HA}$  zusammensetzt.

$$\vec{F}_{PH} = \vec{F}_N + \vec{F}_{HA} \quad (2.37)$$

Daraus ergibt sich eine der Gleichung (2.33) vergleichbare Beziehung für den Struktur-faktor  $\vec{F}_{PH}(+)$  und das komplexe Konjugat seines Bijvoet-Partners  $\vec{F}_{PH}^*(-)$ :

$$\vec{F}_{PH}(+) - \vec{F}_{PH}^*(-) = 2\vec{F}_{HA} \quad (2.38)$$

Die Differenz der Strukturfaktoramplituden der Bijvoet-Paare ist – vergleichbar zu Gleichung (2.34) – gegeben durch:

$$\Delta|F|_{ano} = \left( \left| \vec{F}_{PH}(+) \right| - \left| \vec{F}_{PH}(-) \right| \right) \frac{f'}{2f''} \quad (2.39)$$

Die unter Verwendung einer Patterson-Funktion mit dem Koeffizienten  $(\Delta|F|_{ano})^2$  erhaltene Differenz-Pattersonkarte beschreibt die interatomaren Vektoren der anomal streuenden Atome. Aus diesen kann für eine kleine Zahl von anomal streuenden Atomen ihre Position in der Einheitszelle bestimmt werden und mit Hilfe dieser sowie der atomaren Streufaktoren  $f'$  und  $f''$  der anomal streuenden Atome die anomale Komponente  $\vec{F}_{HA}$  des Strukturfaktors berechnet werden.

$$\vec{F}_{HA}(hkl) = \sum_{j=1}^n (f'_j + if''_j) e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (2.40)$$

Aus der anomalen Komponente des Strukturfaktors  $\vec{F}_{HA}$  und den Amplituden der Strukturfaktoren des Bijvoet-Paares  $\left| \vec{F}_{PH}(+) \right|$  und  $\left| \vec{F}_{PH}(-) \right|$  werden unter Anwendung von Gleichung (2.38) zwei mögliche Phasenwinkel des Strukturfaktors  $\vec{F}_{PH}$  gewonnen.

Der Phasenwinkel des Strukturfaktors wird aus den beiden erhaltenen Paaren von möglichen Winkeln bestimmt, denn analog zum MIR ist lediglich einer der beiden aus den dispersiven Unterschieden erhaltenen Winkel auch eine Lösung für die aus den anomalen Unterschieden bestimmten Winkel.

### „Molecular Replacement“

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Methoden zur Bestimmung der Phasenwinkel, die kein vorheriges Wissen über die untersuchte Proteinstruktur erfordern, wird zur Anwendung des MR das molekulare Modell eines strukturell ähnlichen Proteins benötigt. Dem MR liegt dabei die Annahme zugrunde, dass die unbekannte Proteinstruktur mit Hilfe einer bekannten, ähnlichen Struktur beschrieben werden kann (Huber, 1965), die als Modell fungiert. Für den Fall, dass das verwendete Modell die unbekannte Struktur dabei mit hinreichender Genauigkeit beschreibt, können durch die Überlagerung der beiden Strukturen erste Phasenwinkel für die unbekannte Struktur gefunden werden. Zu diesem Zweck wird das Modell durch eine Rotation parallel zur unbekanntem Struktur ausgerichtet und durch eine Translation mit ihr zur Deckung gebracht. Für diese Aufgabe wird die bereits an anderer Stelle beschriebene Patterson-Funktion verwendet, wobei die sechs-dimensionale Suche häufig zur Senkung des Rechenaufwandes durch die getrennte Durchführung der beiden Schritte auf zwei drei-dimensionale Suchvorgänge reduziert wird. Die Grundlage hierfür bilden die im Folgenden beschriebenen Eigenschaften der Patterson-Funktion.

Die mit Hilfe der Patterson-Funktion berechnete Patterson-Karte beschreibt die interatomaren Vektoren der Atome in der Struktur ausgehend von einem gemeinsamen Ursprung. Die die Beziehung von zwei Atomen im gleichen Protein beschreibenden Vektoren, die so genannten Selbst-Patterson Vektoren (engl. „self-Patterson vectors“), sind dabei in der Regel kurz und

ihre Endpunkte aus diesem Grund in der Nähe des Ursprungs zu finden. Im Unterschied dazu sind die interatomaren Vektoren von zwei Atomen in unterschiedlichen Molekülen auf Grund der in der Regel größeren Abstände der Atome voneinander länger. Die Endpunkte dieser so genannten Kreuz-Patterson Vektoren (engl. „cross-Patterson vectors“) liegen deshalb meistens weiter vom Ursprung entfernt als die der Selbst-Patterson Vektoren. Die vorzugsweise in der inneren Region der Patterson-Karte, in der Umgebung des Ursprungs, vorkommenden Selbst-Patterson Vektoren sind dabei mit Ausnahme einer Rotation identisch für gleiche Moleküle in unterschiedlichen Strukturen. Für strukturell ähnliche Proteine sind die Selbst-Patterson Vektoren nicht identisch, jedoch sehr ähnlich. Deshalb kann aus den Selbst-Patterson Vektoren die zur parallelen Ausrichtung des Modells mit der unbekanntem Struktur im Kristall benötigte Rotation bestimmt werden.

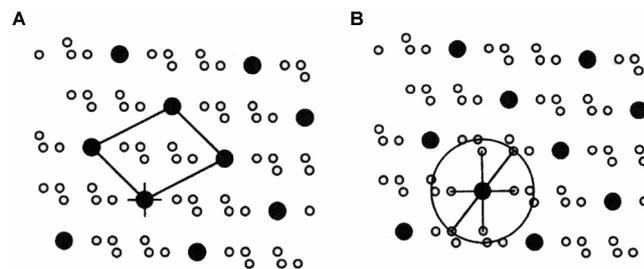


Abb. 2.19: Die Bestimmung der zur parallelen Ausrichtung einer bekannten und einer unbekanntem Struktur im Rahmen des MR benötigten Rotation anhand eines zweidimensionalen Beispiels. Gezeigt ist (A) die Patterson-Karte der unbekanntem Struktur und (B) die Überlagerung der rotierten Patterson-Funktion des bekannten Modells mit der Patterson-Karte der unbekanntem Struktur. Die Patterson-Funktion des Modells wählt dabei sechs Patterson Vektoren der unbekanntem Struktur aus, die alle in einem Kreis liegen, dessen Radius den maximalen Ausmaßen des Modells entspricht (modifiziert nach (Blow, 2002)).

Zu diesem Zweck wird versucht – wie in Abb. 2.19 an einem zweidimensionalen Beispiel gezeigt – die Patterson-Funktion des Modells mit der Patterson-Karte des Kristalls der unbekanntem Struktur durch eine Rotation zur Deckung zu bringen. Hierbei ist die beschriebene unterschiedliche Verteilung der Selbst-Patterson und der Kreuz-Patterson Vektoren von großem Nutzen, denn ohne ein Wissen über die Struktur des Proteins im Kristall wäre es nicht möglich, zwischen den beiden Gruppen von Vektoren zu unterscheiden. Die im Rahmen der praktischen Durchführung eines MR verwendete Rotationsfunktion versucht, die aus dem Modell berechnete Patterson-Funktion mit den im inneren Bereich der Patterson-Karte der unbekanntem Struktur vorkommenden Selbst-Patterson Vektoren durch eine Rotation zur Deckung zu bringen. Der hierfür verwendete innere Bereich entspricht einem kugelförmigen Volumen um den Ursprung der Patterson-Karte, dessen Radius der maximalen Ausdehnung des Modells entspricht. Die im inneren Bereich der Patterson-Karte vorkommenden Kreuz-Patterson Vektoren werden dabei von der Rotationsfunktion nicht berücksichtigt.

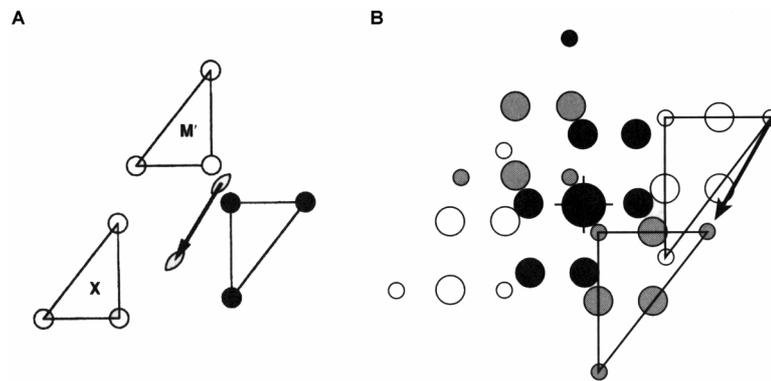


Abb. 2.20: Die Bestimmung der Lage einer zweizähligen Drehachse in einer unbekanntem Struktur relativ zum Ursprung einer bekannten Struktur anhand eines zweidimensionalen Beispiels. Gezeigt ist (A) die Überlagerung der bekannten Struktur M und ihres durch eine zweizählige Drehachse verbundenen Symmetrie-verbundenen M' mit der unbekanntem Struktur X. Der Pfeil repräsentiert die zu bestimmende Translation, um die für die bekannte Struktur angenommene zweizählige Drehachse an ihre Position in der unbekanntem Struktur zu verschieben. In (B) ist die Überlagerung der Patterson-Funktion der bekannten (MM') und der unbekanntem (X) Struktur unter Verwendung des gleichen Ursprungs gezeigt. Die identischen Selbst-Patterson Vektoren der beiden Strukturen sind als schwarze Kreise angedeutet. Die Kreuz-Patterson Vektoren der unbekanntem bzw. der bekannten Struktur sind als nicht gefüllte bzw. graue Kreise gezeigt. Der Vektor, der die gleichen Anordnungen von Kreuz-Patterson Vektoren der beiden Strukturen miteinander verknüpft, entspricht dem Doppelten des in A gezeigten Vektors, der die zweizähligen Drehachsen der beiden Strukturen miteinander verbindet (modifiziert nach (Blow, 2002)).

Nachdem die zur parallelen Ausrichtung des Modells mit der unbekanntem Struktur im Kristall benötigte Rotation bestimmt worden ist, besteht der nächste Schritt in der Positionierung des Modells in der Einheitszelle der unbekanntem Struktur mit Hilfe einer Translation. Dieser Schritt ist jedoch nur notwendig, wenn der Kristall der unbekanntem Struktur weitere Symmetrieelemente neben der Gittersymmetrie enthält. In diesem Fall ist es notwendig die Lage der Drehachsen des Kristalls der unbekanntem Struktur relativ zum Ursprung der bekannten Struktur zu bestimmen. Die Bestimmung der hierzu benötigten Translation erfolgt mit Hilfe der bereits beschriebenen Kreuz-Patterson Vektoren, was in Abb. 2.20 anhand eines zweidimensionalen Beispiels gezeigt ist.

#### 2.4.6 Kryokristallographie

Die Datenaufnahme an Proteinkristallen erfolgt häufig in einem Strahl aus tiefkaltem Stickstoff bei einer Temperatur von 100 K bis 120 K. Auf diese Weise können die im Rahmen der Datenaufnahme – insbesondere bei Verwendung von Synchrotronstrahlung – auftretenden Strahlenschäden, die zu einer Abnahme der Streuqualität der Kristalle führen, stark reduziert werden. Die Kühlung der Proteinkristalle auf eine Temperatur von 100 K bis 120 K erfolgt dabei sprunghaft, um die Bildung von kristallinem Eis zu verhindern, welches das Kristallgitter des Proteinkristalls stark schädigen würde. Zur vollständigen Vermeidung der Bildung von kristallinem Eis wird der Kristall vor der sprunghaften Temperaturänderung in der Regel in eine Lösung überführt, die eine Substanz mit einer kryoprotektiven Wirkung enthält. Substanzen, die häufig zu diesem Zweck eingesetzt werden, sind Glycerin, MPD, Ethylenglykol und Polyethylenglykole mit einem niedrigen Molekulargewicht, wobei die optimalen Bedingungen in Bezug auf die verwendete Substanz und ihre benötigte Konzentration für jede Kristallform auf empirischem Weg bestimmt werden müssen.

Zur Reduzierung der im Zuge der Datenaufnahme auftretenden Strahlenschäden wurden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Röntgenbeugungsexperimente ausnahmslos an tiefgekühlten Proteinkristallen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Proteinkristalle, soweit notwendig, mit einer Nylonschleife (engl. „Cryoloop“) aus dem Kristallisationsansatz in einen geeigneten kryoprotektiven Puffer überführt und dort für 10 bis 30 Sekunden inkubiert. Die Proteinkristalle wurden dann in einem tiefkalten Stickstoffstrahl oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Datenaufnahme in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dewar gelagert. Die Bestimmung geeigneter kryoprotektiver Puffer erfolgte auf empirischem Weg unter Verwendung verschiedener kryoprotektiv wirksamer Substanzen.

#### 2.4.7 Datenaufnahme und Prozessierung

Die Aufnahme aller in dieser Arbeit verwendeten Röntgenbeugungsdaten erfolgte nach der Oszillationsmethode mit Synchrotronstrahlung am Messplatz BW6 der Max-Planck-Gruppen für Strukturelle Molekularbiologie am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY, Hamburg). Die Aufnahme einzelner Beugungsbilder und kompletter Datensätze erfolgte an eingefrorenen Kristallen in einem Strahl aus tiefkaltem Stickstoff.

Für die Aufnahme von vollständigen Datensätzen wurde ein einzelnes Beugungsbild des zu messenden Kristalls aufgenommen. Aus diesem wurde die Beugungsgrenze des Kristalls bestimmt und ein geeigneter Kristall-Detektor Abstand gewählt. Das Beugungsbild wurde unter Verwendung der Programme der HKL-Suite (Otwinowski und Minor, 1997) indiziert und die Intensitäten der Reflexe wurden integriert. Mit Hilfe dieser Informationen wurde mit dem Programm Best (Dr. G. Bourenkov, selbstgeschriebener Skript) eine optimale Strategie berechnet, die die Aufnahme eines vollständigen Datensatz in möglichst kurzer Messzeit erlaubte.

Die Aufnahme der nativen Datensätze des Proteins EhuB im Komplex mit einem seiner Substrate Ectoin oder Hydroxyectoin erfolgte unter Berücksichtigung der mit dem Programm Best ermittelten Strategie an einzelnen Kristallen bei einer Wellenlänge von 1,05 Å.

Die Messung der drei Datensätze, die zur Bestimmung der Phaseninformationen mittels MAD (Hendrickson et al., 1990; Hendrickson et al., 1988; Murthy et al., 1988) benötigt wurden, erfolgte an einem Kristall aus Selenomethionin-markiertem EhuB im Komplex mit Ectoin. Die „remote“, „maximum“ und „inflection“ genannten Datensätze wurden an einem einzelnen Kristall bei Wellenlängen von 0,95 Å (remote), 0,9787 Å (maximum) und 0,9791 Å (inflection) aufgenommen.

Die im Zuge der Datenaufnahme für die unterschiedlichen Datensätze erhaltenen Beugungsbilder wurden mit Hilfe der Programme der HKL-Suite indiziert, integriert und skaliert.

## 2.4.8 Strukturbestimmung von EhuB im Komplex mit Ectoin

### Bestimmung der Phaseninformation

Die Bestimmung der Phasenwinkel der Strukturfaktoren erfolgte nach der Methode der MAD an einem Kristall aus Selenomethionin-markiertem EhuB im Komplex mit Ectoin. Die Positionen der anomal streuenden Selenatome, die Phasenwinkel der Strukturfaktoren und die Elektronendichte wurden mit Hilfe der drei zu diesem Zweck bei unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommenen Datensätze unter Verwendung von SOLVE (Terwilliger und Berendzen, 1999) mit einem angepassten Skript ([www.solve.lanl.gov/html\\_solve/manual/sample\\_scripts/one\\_mad\\_dataset\\_solve.txt](http://www.solve.lanl.gov/html_solve/manual/sample_scripts/one_mad_dataset_solve.txt)) berechnet.

### Statistische Dichtemodifikation und automatischer Modellbau

Die erhaltene Elektronendichte wurde unter Verwendung von RESOLVE (Terwilliger, 2000) mit einem angepassten Skript ([www.solve.lanl.gov/html\\_resolve/resolve\\_build.txt](http://www.solve.lanl.gov/html_resolve/resolve_build.txt), Version 2.06.21) mittels statistischer Dichtemodifikation verbessert; in diese Elektronendichte wurde dann automatisch ein Modell der Polypeptidkette gelegt. Der automatische Modellbau (Terwilliger, 2003) erfolgte in einem iterativen Verfahren aus Modellbau mit RESOLVE und einer Verfeinerung des erhaltenen Modells mit dem Programm Refmac5 (Murshudov et al., 1997) aus der CCP4 Suite (kein Autor, 1994). Zur Kontrolle der Verfeinerung wurden dabei 5% der Reflexe von der Verfeinerung ausgenommen und zur Berechnung des modellunabhängigen Qualitätsindex  $R_{\text{free}}$  (Brünger, 1992; Brünger, 1993) verwendet. Das automatisch gebaute Modell wurde visuell mit Hilfe des Programms O (Jones et al., 1991) kontrolliert.

### Manueller Modellbau

Die nach dem automatischen Modellbau fehlenden Teile des Modells wurden manuell in die vorhandene Elektronendichte in  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten eingepasst und in das Modell eingefügt.

### Modellverfeinerung

Die Verfeinerung der atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des Modells erfolgte mittels iterativer Zyklen aus einer Verfeinerung mit isotropen Temperaturfaktoren durch Refmac5 unter Verwendung der experimentellen Phasen und Amplituden der Strukturfaktoren und manuellen Korrekturen des Modells in O auf Basis von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten. Zur Kontrolle der Verfeinerung wurden 5% der Reflexe von der Verfeinerung ausgenommen und zur Berechnung des modellunabhängigen Qualitätsindex  $R_{\text{free}}$  verwendet. Die Berechnung der Elektronendichte-Karten erfolgte mit dem Programm FFT der CCP4 Suite.

### Einfügen der Liganden in das Modell

Im Anschluss an die Verfeinerung des Modells wurde das gebundene Substrat Ectoin in die deutlich sichtbare Elektronendichte in  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten eingepasst und in das Modell eingefügt. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe des PRODRG Server (Schüttelkopf und van Aalten, 2004) die notwendigen Koordinaten und die zur Verfeinerung mit Refmac5 benötigte Topologiedatei erzeugt. Weiterhin wurden vier Cadmium-Ionen in

vier deutlich sichtbare Elektronendichten auf der Oberfläche des Proteins eingepasst und in das Modell eingefügt. Die atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des erhaltenen Modells wurden durch iterative Zyklen aus einer Verfeinerung mit Refmac5 und manuellen Korrekturen des Modells in O auf Basis von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten verfeinert. In den ersten Runden erfolgte die Verfeinerung mit isotropen Temperaturfaktoren unter Verwendung der experimentellen Phasen und Amplituden der Strukturfaktoren. Im Unterschied dazu wurde im letzten Zyklus eine TLS-Verfeinerung (Winn et al., 2001) verwendet, für die das Protein entsprechend seiner Domänengrenzen in zwei TLS-Gruppen aufgeteilt wurde. Zur Kontrolle der Verfeinerung wurden 5% der Reflexe von der Verfeinerung ausgenommen und zur Berechnung des modellunabhängigen Qualitätsindex  $R_{free}$  verwendet.

### **„Rigid body“ Verfeinerung**

Eine weitere Verbesserung der Modellqualität wurde durch die Verwendung des nativen Datensatzes von EhuB im Komplex mit Ectoin erreicht. Zu diesem Zweck wurden aus dem Modell des Selenomethionin-markierten EhuB der Ligand Ectoin sowie die vier Cadmium-Ionen entfernt. Anschließend wurde eine „Rigid body“ Verfeinerung des erhaltenen Modells mit dem nativen Datensatz von EhuB im Komplex mit Ectoin durchgeführt. Die Auflösung des nativen Datensatzes wurde dabei auf Grund der hohen  $R_{sym}$  Werte in den letzten Auflösungsstufen auf 1,9 Å beschränkt, was für alle weiteren Verfeinerungsrunden dieser Struktur ebenso gilt. Das auf diese Weise erhaltene Modell wurde mit isotropen Temperaturfaktoren unter Verwendung von Refmac5 verfeinert.

### **Manueller Modellbau und Verfeinerung**

Die unter Verwendung des nativen Datensatzes von EhuB im Komplex mit Ectoin erhaltenen  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten erlaubten das manuelle Einpassen der fehlenden Teile der Polypeptidkette in die deutlich sichtbare Elektronendichte mit Hilfe von O. Das so erhaltene Modell wurde wie im Abschnitt „Modellverfeinerung“ beschrieben verfeinert, wobei abweichend keine experimentellen Phasen verwendet wurden.

### **Einfügen der Liganden in das Modell**

Der Ligand Ectoin sowie die vier Cadmium-Ionen wurden unter Verwendung von O manuell in die deutlich sichtbaren Elektronendichten in  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten eingepasst und in das Modell eingefügt. Die atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des Modells wurden, wie im Abschnitt „Modellverfeinerung“ beschrieben verfeinert, wobei abweichend keine experimentellen Phasen verwendet wurden.

### **Einfügen von Wassermolekülen in das Modell**

Die in den Elektronendichte-Karten sichtbaren Wassermoleküle wurden automatisch mit Hilfe von ARP/wARP (Lamzin und Wilson, 1993) bei einem Schwellenwert von  $2,5 \sigma$  identifiziert. Nach einer visuellen Überprüfung der Wassermoleküle mit Hilfe von O in  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten wurden Wassermoleküle mit eindeutiger Elektronendichte in das Modell eingefügt. Die atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des erhaltenen Modells wurden durch iterative Zyklen aus einer Verfeinerung mit Refmac5 und manuellen Korrektu-

ren des Modells in O auf Basis von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten verfeinert. In den ersten Runden erfolgte die Verfeinerung mit isotropen Temperaturfaktoren. Im Unterschied dazu wurde im letzten Zyklus eine TLS-Verfeinerung verwendet, für die das Protein entsprechend seiner Domänengrenzen in zwei TLS-Gruppen aufgeteilt wurde. Zur Kontrolle der Verfeinerung wurden 5% der Reflexe von der Verfeinerung ausgenommen und zur Berechnung des modellunabhängigen Qualitätsindex  $R_{\text{free}}$  verwendet.

#### 2.4.9 Strukturbestimmung von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin

##### „Molecular Replacement“

Die Bestimmung der zur Berechnung einer Elektronendichte-Karte notwendigen Phaseninformationen für den Datensatz von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin erfolgte mittels MR unter Verwendung von AMoRe (Navaza, 1994) aus der CCP4 Suite. Für das MR wurde als Suchmodell die EhuB Struktur im Komplex mit Ectoin nach der Entfernung des Liganden Ectoin, der Cadmium-Ionen und der Wassermoleküle verwendet. Die atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des als eindeutige Lösung aus dem MR erhaltenen Modells wurden durch iterative Zyklen aus einer Verfeinerung mit isotropen Temperaturfaktoren unter Verwendung von Refmac5 und manuellen Korrekturen des Modells in O auf Basis von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten verfeinert. Die Auflösung des nativen Datensatzes von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin wurde dabei auf 2,5 Å beschränkt, was für die weitere Verfeinerung dieser Struktur ebenso gilt. Zur Kontrolle der Verfeinerung wurden 5% der Reflexe von der Verfeinerung ausgenommen und zur Berechnung des modellunabhängigen Qualitätsindex  $R_{\text{free}}$  verwendet.

##### Einfügen der Liganden in das Modell

Nach der Verfeinerung des Modells wurde der gebundene Ligand Hydroxyectoin in die deutlich sichtbare Elektronendichte in  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten unter Verwendung von O eingepasst und in das Modell eingefügt. Hierfür wurden mit Hilfe des PRODRG Server die notwendigen Koordinaten und die zur Verfeinerung mit Refmac5 benötigte Topologiefile erzeugt. Weiterhin wurden vier Cadmium-Ionen in vier deutlich sichtbare Elektronendichten auf der Oberfläche des Proteins eingepasst und in das Modell eingefügt. Die atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des Modells wurden, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, verfeinert.

##### Einfügen von Wassermolekülen in das Modell

Die in den Elektronendichte-Karten sichtbaren Wassermoleküle wurden automatisch mit Hilfe von ARP/wARP unter Verwendung eines Schwellenwerts von  $3,2 \sigma$  identifiziert. Die erhaltenen Wassermoleküle wurden einzeln mit Hilfe von O in  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten überprüft und bei eindeutiger Elektronendichte in das Modell eingefügt. Die atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des erhaltenen Modells wurden durch iterative Zyklen aus einer Verfeinerung mit Refmac5 und manuellen Korrekturen des Modells in O auf Basis von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten verfeinert. In den ersten Runden erfolgte die Verfeinerung mit isotropen Temperaturfaktoren. Im Unterschied dazu wurde im letzten Zyklus

eine TLS-Verfeinerung verwendet, für die das Protein entsprechend seiner Domänengrenzen in zwei TLS-Gruppen aufgeteilt wurde. Zur Kontrolle der Verfeinerung wurden 5% der Reflexe von der Verfeinerung ausgenommen und zur Berechnung des modellunabhängigen Qualitätsindex  $R_{\text{free}}$  verwendet.

#### **2.4.10 Analyse der Strukturmodelle**

Die stereochemische Qualität der erhaltenen Proteinmodelle wurde mit Hilfe des Programms PROCHECK Version 3.5 (Laskowski et al., 1993) analysiert. Die Identifizierung von Sekundärstrukturelementen in den Proteinmodellen erfolgte mit Hilfe des Programms Stride (Frishman & Argos (1995) Proteins).

#### **2.4.11 Graphische Darstellung**

Die zur Visualisierung der Struktur verwendeten Abbildungen wurden mit Hilfe des Programms „The PyMOL Molecular Graphics System“ ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) von Warren L. DeLano (DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA) unter Verwendung des implementierten „ray-tracer“ erzeugt.

#### **2.4.12 Überlagerung von Proteinstrukturen**

Die Überlagerung von Proteinstrukturen erfolgte mit dem im Programm LSQMAN (Kleywegt, 1999) implementierten „global superposition-distance-based Needleman-Wunsch“ Algorithmus mit einem Distanzschwellenwert von 3,5 Å.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Der MDR-ABC-Transporter LmrA

#### 3.1.1 Homologe Expression von LmrA in *L. lactis*

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines Membranproteins benötigt häufig große Mengen an gereinigtem Protein (Ostermeier und Michel, 1997). Auf Grund der im Vergleich zu löslichen Proteinen in der Regel niedrigeren Expressionsniveaus dieser Proteinklasse (Seddon et al., 2004) sind deshalb oft große Kulturvolumina zur Expression ausreichender Proteinmengen erforderlich. Vor diesem Hintergrund wurde, um die für strukturbiochemische Untersuchungen benötigten Proteinmengen bereitzustellen, ein Protokoll für die homologe Expression von LmrA in *L. lactis* unter Verwendung eines 100 l Fermenters entwickelt. Im Zuge der Etablierung dieses Protokolls zeigte sich, dass die Luftzufuhr während des Wachstums der Bakterien ein wichtiger Parameter war, der das Expressionsniveau von LmrA beeinflusste. Eine detaillierte Untersuchung dieses Zusammenhanges erfolgte jedoch mit Blick auf die Zielsetzung dieser Arbeit nicht.

Die homologe Expression von LmrA im *L. lactis* Stamm *NZ9000 pNHLmrA* erfolgte in einem mit 100 l M17 Medium gefüllten Fermenter bei 100 Umdrehungen pro Minute des Rührwerks, einer Temperatur von 30°C und einer Zufuhr von 1-2 l Luft pro Minute. Nach dem die *L. lactis* Kultur unter den genannten Bedingungen eine OD<sub>660</sub> von 0,8 erreicht hatte, erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von 0,4 % des Kulturvolumens eines NisinA enthaltenden Überstandes des *L. lactis* Stamms *NZ9700*. Nach weiteren ein bis zwei Stunden Wachstum, innerhalb welcher die Kultur eine OD<sub>660</sub> von 1,1 bis 1,4 erreichte, wurden die Bakterien durch Zentrifugation (15 min; 6000 g; 4°C) sedimentiert, wobei sich in der Regel 400 bis 450 ml Bakterienpellet ergaben. Das erhaltene Pellet wurde mit Puffer gewaschen und die Bakterien bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Das im Rahmen des beschriebenen Protokolls erreichte Expressionsniveau der *L. lactis* für LmrA entspricht weitgehend dem des veröffentlichten Protokolls (Margolles et al., 1999).

#### 3.1.2 Charakterisierung verschiedener LmrA Präparationen

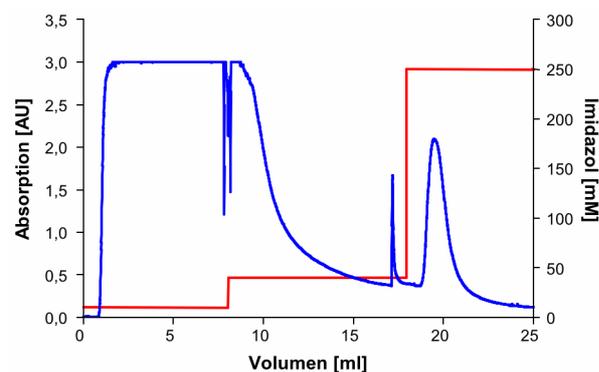
Zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines Membranproteins mittels Röntgenstrukturanalyse ist es in der Regel notwendig dieses durch die Verwendung eines Detergens aus der Membran herauszulösen und es in Form von Protein-Detergens-Komplexen zu isolieren. Das zu diesem Zweck verwendete Detergens besitzt häufig einen großen Einfluss auf Monodispersität, Stabilität und Aktivität der erhaltenen Präparation (Engel et al., 2002; Lemieux et al., 2002; Li et al., 2001), die ihrerseits Auswirkungen auf die Bildung von Proteinkristallen zu haben scheint (Lemieux et al., 2002). Vor diesem Hintergrund wurde der MDR-ABC-Transporter LmrA mit den 43 in Tab. 3.1 gezeigten Detergenzien, die das

gesamte Spektrum dieser Substanzklasse abdecken, solubilisiert und mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung des entsprechenden Detergens gereinigt.

| Detergens                                               | Konzentration Solubilisierung | Konzentration für die Affinitätschromatographie |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------|
| 2-Carboxy- $\omega$ -heptadecenamidopropyl dimethylamin | 1 %                           | 0,00095 % (2,5x cmc)                            |
| 6-O-Methyl-n-heptylcarboxyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid | 1 %                           | 0,345 % (1,5x cmc)                              |
| Big CHAP, deoxy                                         | 1 %                           | 0,24 % (2,0x cmc)                               |
| C-DODECAFOS                                             | 2 %                           | 0,77 % (1,0x cmc)                               |
| CHAPSO                                                  | 2 %                           | 0,75 % (1,5x cmc)                               |
| C-HEGA-11                                               | 1 %                           | 0,495 % (1,1x cmc)                              |
| CYFOS-5                                                 | 1 %                           | 0,375 % (2,5x cmc)                              |
| CYFOS-7                                                 | 1 %                           | 0,055 % (2,5x cmc)                              |
| CYGLU-4                                                 | 1 %                           | 0,145 % (2,5x cmc)                              |
| CYMAL-5                                                 | 1 %                           | 0,300 % (2,5x cmc)                              |
| CYMAL-7                                                 | 1 %                           | 0,02475 % (2,5x cmc)                            |
| Decyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                        | 1 %                           | 0,175 % (2,5x cmc)                              |
| Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                        | 1 %                           | 0,2175 % (2,5x cmc)                             |
| Dimethyldecylphosphinoxid                               | 1 %                           | 0,25 % (2,5x cmc)                               |
| Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid                         | 1 %                           | 0,0575 % (2,5x cmc)                             |
| Dodecyl-N,N-dimethylglycin                              | 1 %                           | 0,1025 % (2,5x cmc)                             |
| Dodecyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                      | 1 %                           | 0,0165 % (2,5x cmc)                             |
| Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                      | 1 %                           | 0,02 % (2,3x cmc)                               |
| FOS-CHOLINE 12                                          | 1 %                           | 0,1175 % (2,5x cmc)                             |
| FOS-CHOLINE 14                                          | 1 %                           | 0,0115 % (2,5x cmc)                             |
| FOS-CHOLINE 16                                          | 1 %                           | 0,001325 % (2,5x cmc)                           |
| FOSFEN-9                                                | 1 %                           | 0,13 % (2,5x cmc)                               |
| FOS-MEA-10                                              | 1 %                           | 0,375 % (2,5x cmc)                              |
| FOS-MEA-12                                              | 1 %                           | 0,035 % (2,5x cmc)                              |
| HEGA-11                                                 | 1 %                           | 0,1375 % (2,5x cmc)                             |
| Hexadecyltrimethylammoniumbromid                        | 1 %                           | 0,091 % (2,5x cmc)                              |
| N,N-Dimethyl (3-carboxy-4-dodec-5-ene) amidopropylamin  | 1 %                           | 0,0178 % (2,5x cmc)                             |
| Natrium Bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat                  | 1 %                           | 0,2 %                                           |
| Natrium Cholat                                          | 2 %                           | 0,41 % (1,0x cmc)                               |
| Natrium Dodecanoylsarcosine                             | 1 %                           | 0,42 % (1,0x cmc)                               |
| NP-40                                                   | 1 %                           | 0,125 %                                         |
| Octaethylglycolmonododecylether                         | 1 %                           | 0,0120 % (2,5x cmc)                             |
| Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                        | 1 %                           | 1,06 % (2,0x cmc)                               |
| Pentaethylglycolmonodecylether                          | 1 %                           | 0,0775 % (2,5x cmc)                             |
| Sucrose Monododecanoat                                  | 1 %                           | 0,04 % (2,5x cmc)                               |
| Tetradecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid                      | 1 %                           | 0,01875 % (2,5x cmc)                            |
| Tetradecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                   | 1 %                           | 0,00135 % (2,5x cmc)                            |
| Triton X-100                                            | 1 %                           | 0,0375 % (2,5x cmc)                             |
| Tween 20                                                | 1 %                           | 0,018 % (2,5x cmc)                              |
| Zwittergent 3-10                                        | 2 %                           | 1,230 % (1,0x cmc)                              |
| Zwittergent 3-12                                        | 1 %                           | 0,335 % (2,5x cmc)                              |
| Zwittergent 3-14                                        | 1 %                           | 0,0175 % (2,5x cmc)                             |
| Zwittergent 3-16                                        | 1 %                           | 0,0059 % (2,5x cmc)                             |

Tab. 3.1: Detergenzien zur Reinigung von LmrA. Gezeigt sind die verwendeten Detergenzien sowie ihre zur Solubilisierung und Affinitätsreinigung eingesetzten Konzentrationen (in Gewichtsprozenten). Die Konzentrationen sind zusätzlich – soweit bekannt – in Vielfachen der kritischen Mizellenkonzentration (cmc) angegeben.

Die auf diese Weise erhaltenen Präparationen wurden in Bezug auf ihre Monodispersität, Stabilität und Aktivität charakterisiert. Für die Reinigung von LmrA wurden die aus einem Kulturvolumen von 15 l erhaltenen *L. lactis* mit Lysozym und DNase I versetzt und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend für 10 Minuten auf Eis gekühlt und mittels einer dreimaligen Passage bei 2500 bar durch ein auf 4°C gekühltes Zellaufschlussgerät lysiert. Die erhaltene Suspension wurde zentrifugiert (45 min; 13000 g bzw. 25000 g; 4°C) und anschließend die in Lösung verbliebenen Membranen durch Zentrifugation (60 min; 125000 g; 4°C) sedimentiert. Das erhaltene Membranpellet wurde in 5 ml Puffer 1 homogenisiert und normalerweise je ein Drittel dieser Suspension in insgesamt 10 ml Puffer 1 mit der angegebenen Konzentrationen eines der in *Tab. 3.1* gezeigten Detergenzien für 30 Minuten bei 4°C solubilisiert. Im Anschluss an die Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (30 min; 125000g; 4°C) erfolgte die Reinigung von LmrA mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung des zur Solubilisierung eingesetzten Detergens bei 4°C. Ein typisches Chromatogramm des beschriebenen Reinigungsprotokolls zeigt *Abb. 3.1*.



*Abb. 3.1:* Chromatogramm der Reinigung von LmrA. Gezeigt ist das Chromatogramm (in blau, 280 nm) der Reinigung mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie unter Verwendung des Detergens FOS-CHOLINE-16 sowie die im Rahmen dessen verwendeten Imidazol Konzentrationen (in rot).

Die erhaltenen Präparationen wurden in der Regel am ersten und am siebten Tag nach der Reinigung mittels Gelfiltrationschromatographie und durch die Bestimmung der spezifischen ATPase-Aktivität in Detergenslösung charakterisiert.

Für die Analyse mittels Gelfiltrationschromatographie wurden normalerweise 50 µl der Präparation verwendet, die mit Puffer 4 versetzt mit der in *Tab. 3.1* angegebenen Konzentration des zur Reinigung verwendeten Detergens als Laufmittel unter Verwendung einer Superose 12 3.2/30 Säule aufgetrennt wurden. Die Kalibrierung der Chromatogramme in Bezug auf das Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe löslicher Referenzproteine.

Die Bestimmung der spezifischen ATPase-Aktivität erfolgte durch die Quantifizierung des bei der Reaktion freigesetzten anorganischen Phosphats in einem Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 200 µl in Puffer 4 versetzt mit der in *Tab. 3.1* angegebenen Konzentration des zur Reinigung verwendeten Detergens. Für die unterschiedlichen Präparationen wurden hierbei entsprechend ihrer Aktivität 1 bis 25 µl Proteinlösung verwendet. Die ATP- bzw. MgCl<sub>2</sub>-Konzentration der Ansätze betrug 1 mM bzw. 5 mM und die ATPase-Aktivität wurde in Gegenwart oder Abwesenheit von Verapamil über einen Zeitraum von 30 und 60 Minuten

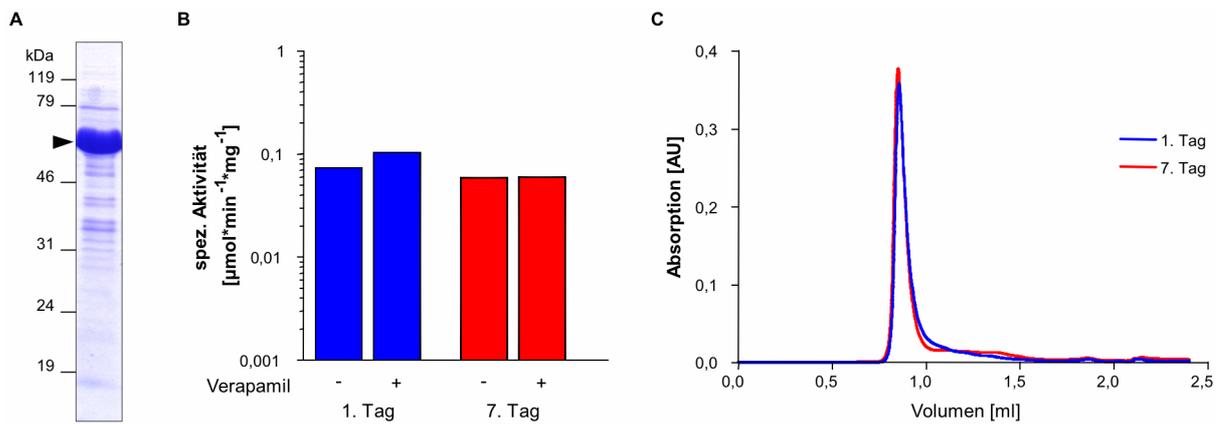
bestimmt. Nach Abschluss der Reaktionen wurde die Menge an freigesetztem anorganischem Phosphat spektroskopisch quantifiziert (Baykov et al., 1988). Die über einen Zeitraum von 30 bzw. 60 Minuten bestimmten spezifischen ATPase-Aktivitäten waren in der Regel vergleichbar, weshalb im Folgenden lediglich die 60 Minuten Werte angegeben werden.

Die unter Verwendung der in *Tab. 3.1* aufgeführten Detergenzien erhaltenen Präparationen von LmrA zeigten im Rahmen ihrer Charakterisierung, wie erwartet, sehr unterschiedliche Ergebnisse von denen ausgewählte im Folgenden exemplarisch wiedergegeben werden. Im Interesse einer übersichtlichen Präsentation wurden die Detergenzien entsprechend der Eigenschaften ihrer Präparationen in fünf Gruppen eingeteilt. Das Hauptkriterium für die Einteilung der Gruppen war die Monodispersität der Präparation die im Wesentlichen auf Basis der Chromatogramme der Gelfiltrationsläufe beurteilt wurde. Von Bedeutung für die Gruppeneinteilung war weiterhin die Stabilität der Präparation, die anhand der Veränderung des Chromatogramms der Gelfiltration im Zuge der Lagerung der Proteinlösung bei 4°C beurteilt wurde. Die spezifischen ATPase-Aktivitäten der Präparationen waren bei der Einteilung der Gruppen von untergeordneter Bedeutung.

In der ersten Gruppe wurden Detergenzien zusammengefasst, die mit dem beschriebenen Protokoll nicht in der Lage waren eine signifikante Menge an LmrA ( $> 300 \mu\text{g}$ ) zu reinigen. Als Vertreter dieser Gruppe von Detergenzien seien C-HEGA-11, Dodecyl- $\beta$ -D-glucopyranosid und FOS-MEA-12 genannt.

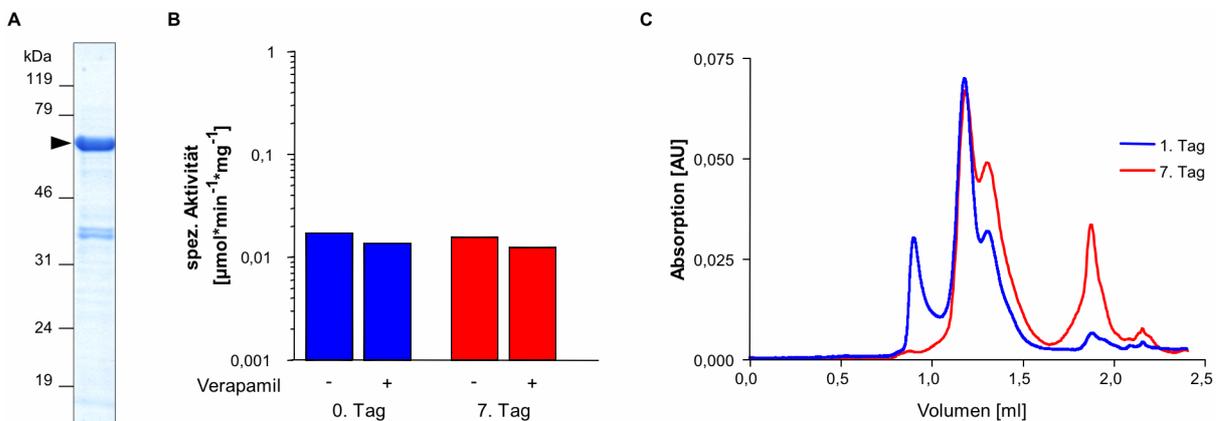
Die in die zweite Gruppe eingeteilten Detergenzien zeigten eine große Heterogenität der unter ihrer Verwendung erhaltenen Präparationen. Diese äußerte sich in einer Vielzahl von Signalen in den Chromatogrammen der Gelfiltrationsläufe. Typische Vertreter dieser Gruppe von Detergenzien waren z.B. Tetradecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid und Dimethyldecylphosphinoxid.

Die dritte Gruppe von Detergenzien zeichnete sich bei Analyse der unter ihrer Verwendung erhaltenen Präparationen mittels Gelfiltrationschromatographie durch ein Hauptsignal im Ausschlussvolumen aus, was auf eine Aggregation von LmrA hindeutet. In Bezug auf die spezifische ATPase-Aktivität zeigten die erhaltenen Präparationen ein uneinheitliches Bild mit niedrigen aber auch vergleichsweise hohen spezifischen ATPase-Aktivitäten. Ein typischer Vertreter der dritten Gruppe von Detergenzien ist das Tetradecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid. Dieses zeigte, wie in *Abb. 3.2C* dargestellt, am ersten sowie am siebten Tag nach der Reinigung im Chromatogramm der Gelfiltration lediglich ein Signal im Ausschlussvolumen. Die spezifische ATPase-Aktivität der Tetradecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid Präparation betrug am ersten Tag nach der Reinigung  $0,074 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  und nahm im Verlauf einer Woche leicht ab. Weiterhin war die spezifische ATPase-Aktivität zu keinem Zeitpunkt in einem signifikanten Ausmaß durch Verapamil stimulierbar.



**Abb. 3.2:** Die Reinigung von LmrA mit Tetradecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid. Zur Charakterisierung der erhaltenen Präparation wurde die Fraktion der IMAC mit der höchsten Proteinkonzentration wie folgt analysiert: **(A)** Ein 12 % SDS-PAGE für den 4  $\mu$ g Protein aufgetragen wurden, wobei das LmrA entsprechende Molekulargewicht durch einen Pfeil gekennzeichnet ist. **(B)** Die spezifische ATPase-Aktivität mit einer logarithmischen Skala am ersten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung in Gegenwart oder Abwesenheit von 50  $\mu$ M Verapamil. **(C)** Das Chromatogramm der Gelfiltration bei einer Wellenlänge von 280 nm am ersten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung bei Verwendung einer Superose 12 3.2/30 Säule.

Die ganze Breite der Eigenschaften der in der vierten Gruppe zusammengefassten Detergenzien zeigen die Beispiele, die in *Abb. 3.3* bis *Abb. 3.8* dargestellt sind. Die in ihnen abgebildeten Chromatogramme verdeutlichen das gemeinsame Merkmal der unter Verwendung dieser Detergenzien erhaltenen Präparationen, welches ein Hauptsignal außerhalb des Ausschlussvolumens mit weiteren Signalen ist.

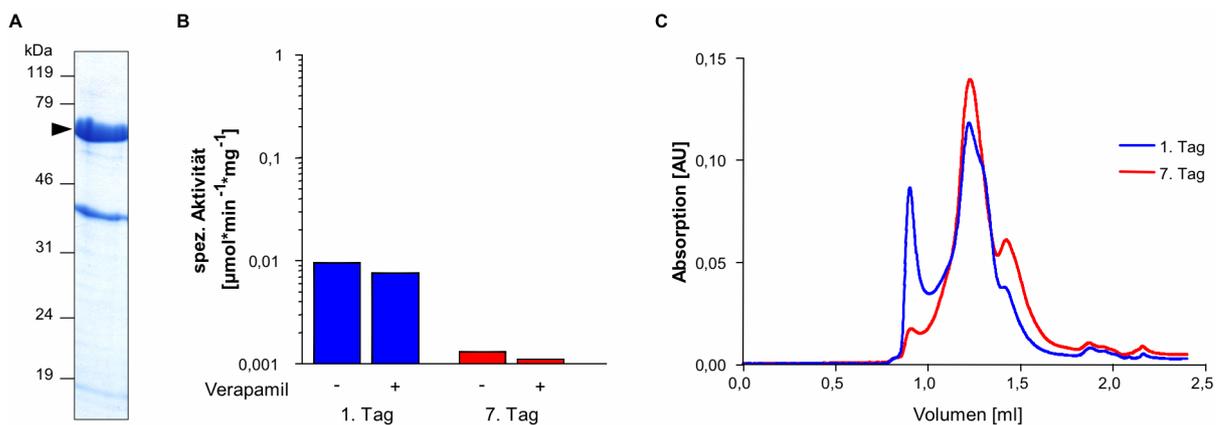


**Abb. 3.3:** Die Reinigung von LmrA mit FOS-CHOLINE-14. Zur Charakterisierung der erhaltenen Präparation wurde die Fraktion der IMAC mit der höchsten Proteinkonzentration wie folgt analysiert: **(A)** Ein 12 % SDS-PAGE für den 6  $\mu$ g Protein aufgetragen wurden, wobei das LmrA entsprechende Molekulargewicht durch einen Pfeil gekennzeichnet ist. **(B)** Die spezifische ATPase-Aktivität mit einer logarithmischen Skala am Tag der Reinigung (blau) und am siebten (rot) Tag nach der Reinigung in Gegenwart oder Abwesenheit von 50  $\mu$ M Verapamil. **(C)** Das Chromatogramm der Gelfiltration bei einer Wellenlänge von 280 nm am ersten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung bei Verwendung einer Superose 12 3.2/30 Säule.

Die erste beispielhaft dargestellte Präparation wurde unter Verwendung von FOS-CHOLINE-14 gewonnen und ergab eine Ausbeute von 1,2 mg Protein. Die Analyse der Präparation mittels Gelfiltrationschromatographie am ersten Tag nach der Reinigung zeigte drei Signale, die dem Ausschlussvolumen sowie einem Molekulargewicht von 340 kDa und 150 kDa entsprechen. Im Unterschied dazu lieferte die erneute Analyse der Präparation am siebten Tag nach der Reinigung Signale, die einem Molekulargewicht von 340 kDa, 150 kDa und 3 kDa entsprechen. Die Bestimmung der spezifischen ATPase-Aktivität der Präparation am Tag der Reinigung lieferte einen Wert von  $0,017 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , der sich bis zu seiner erneuten

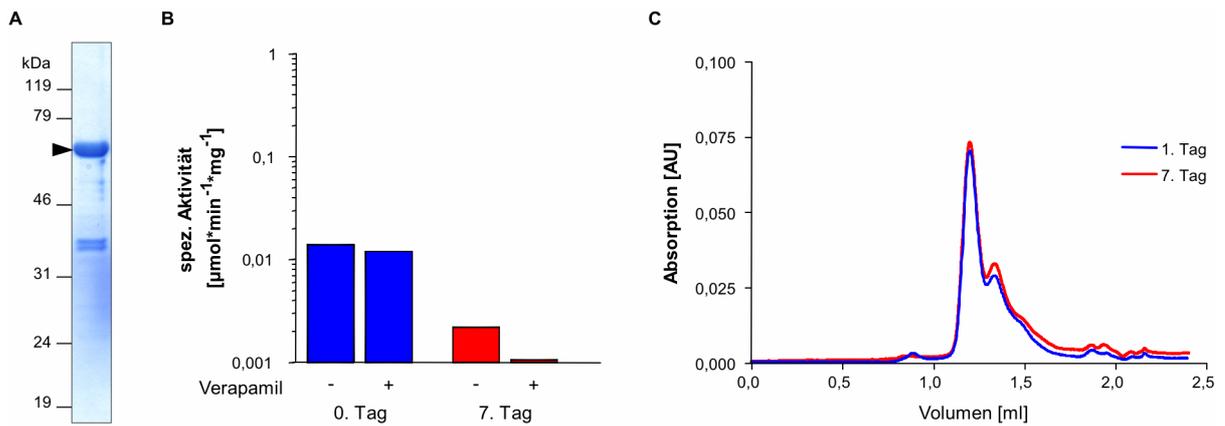
Bestimmung am siebten Tag nach der Reinigung nur unwesentlich veränderte. Weiterhin war die spezifische ATPase-Aktivität der Präparation zu keinem Zeitpunkt signifikant durch Verapamil stimulierbar.

Die unter Verwendung von Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid erhaltene Präparation (*Abb. 3.4*) ergab eine Proteinausbeute von 1,5 mg. Ihre Analyse mittels Gelfiltrationschromatographie zeigte am ersten Tag nach der Reinigung Signale, die entsprechend der Kalibrierung der Säule dem Ausschlussvolumen sowie einem Molekulargewicht von 250 kDa und 70 kDa entsprachen, wobei das Signal bei 250 kDa an seiner abfallenden Flanke eine Schulter aufwies. Die erneute Analyse dieser Präparation am siebten Tag nach der Reinigung zeigte die drei bereits beschriebenen Signale, wobei jedoch das Signal im Ausschlussvolumen an Intensität verloren hatte, während die beiden verbleibenden Signale an Intensität zunahmen. Weiterhin war die Schulter in der abfallenden Flanke des Signals bei 250 kDa verschwunden. Die Bestimmung der spezifischen ATPase-Aktivität der Präparation am ersten Tag nach der Reinigung ergab einen Wert von  $0,010 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , der im Zuge der Lagerung stark abfiel und zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Stimulation durch Verapamil zeigte.



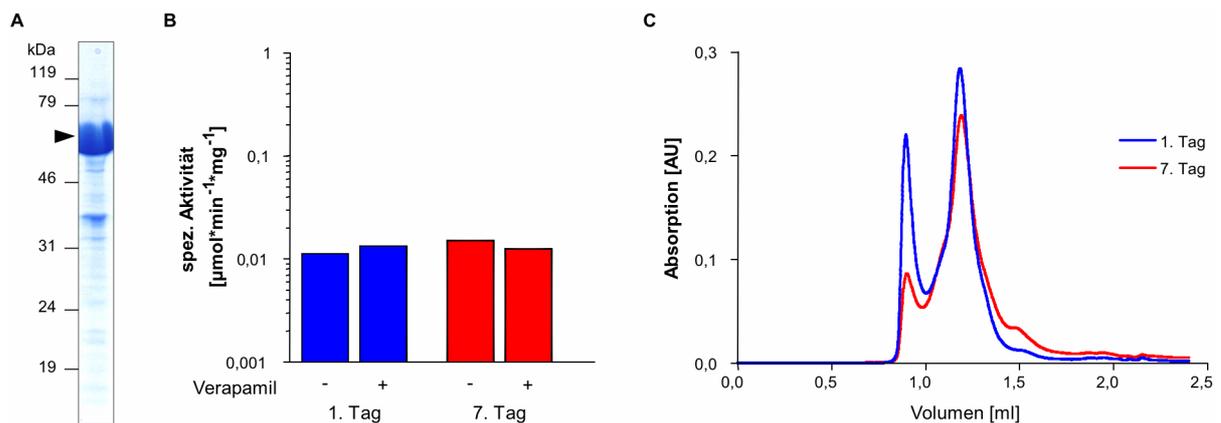
*Abb. 3.4:* Die Reinigung von LmrA mit Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid. Zur Charakterisierung der erhaltenen Präparation wurde die Fraktion der IMAC mit der höchsten Proteinkonzentration wie folgt analysiert: **(A)** Ein 12 % SDS-PAGE für den 11  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen wurden, wobei das LmrA entsprechende Molekulargewicht durch einen Pfeil gekennzeichnet ist. **(B)** Die spezifische ATPase-Aktivität mit einer logarithmischen Skala am ersten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung in Gegenwart oder Abwesenheit von  $50 \mu\text{M}$  Verapamil. **(C)** Das Chromatogramm der Gelfiltration bei einer Wellenlänge von 280 nm am ersten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung bei Verwendung einer Superose 12 3.2/30 Säule.

Die Charakterisierung der unter Verwendung von FOS-CHOLINE-12 gewonnenen Präparation, die eine Proteinausbeute von 1,5 mg lieferte, ist in *Abb. 3.5* gezeigt. Die Analyse der Präparation mittels Gelfiltrationschromatographie ergab am ersten und am siebten Tag nach der Reinigung zwei Signale. Diese entsprachen einem Molekulargewicht von 290 kDa und 120 kDa, wobei die abfallende Flanke des Signals bei 120 kDa eine Schulter aufwies. Die mit  $0,014 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  geringe spezifische ATPase-Aktivität der Präparation am Tag der Reinigung – in Gegenwart oder Abwesenheit von Verapamil – verschwand im Zuge der Lagerung bei  $4^\circ\text{C}$  fast vollständig.



**Abb. 3.5:** Die Reinigung von LmrA mit FOS-CHOLINE-12. Zur Charakterisierung der erhaltenen Präparation wurde die Fraktion der IMAC mit der höchsten Proteinkonzentration wie folgt analysiert: **(A)** Ein 12 % SDS-PAGE für den 8  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen wurden, wobei das LmrA entsprechende Molekulargewicht durch einen Pfeil gekennzeichnet ist. **(B)** Die spezifische ATPase-Aktivität mit einer logarithmischen Skala am Tag der Reinigung (blau) und am siebten (rot) Tag nach der Reinigung in Gegenwart oder Abwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Verapamil. **(C)** Das Chromatogramm der Gelfiltration bei einer Wellenlänge von 280 nm am ersten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung bei Verwendung einer Superose 12 3.2/30 Säule.

Die unter Verwendung von Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid erhaltene Präparation, deren Charakterisierung in *Abb. 3.6* dargestellt ist, ergab eine Proteinausbeute von 1,8 mg. Das am ersten Tag nach der Reinigung für diese Präparation erhaltene Chromatogramm der Gelfiltration zeigte zwei Signale, die dem Ausschlussvolumen und einem Molekulargewicht von 330 kDa entsprachen. Die erneute Analyse der Präparation am siebten Tagen nach der Reinigung ergab eine starke Abnahme der Intensität des Signals im Ausschlussvolumen sowie eine Verringerung der Intensität des Signals bei 330 kDa. Die mit  $0,011 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  vergleichsweise geringe spezifische ATPase-Aktivität der Präparation am ersten Tag nach der Reinigung – in Gegenwart oder Abwesenheit von Verapamil – veränderte sich im Zuge der Lagerung nicht signifikant.



**Abb. 3.6:** Die Reinigung von LmrA mit Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid. Zur Charakterisierung der erhaltenen Präparation wurde die Fraktion der IMAC mit der höchsten Proteinkonzentration wie folgt analysiert: **(A)** Ein 12 % SDS-PAGE für den 16  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen wurden, wobei das LmrA entsprechende Molekulargewicht durch einen Pfeil gekennzeichnet ist. **(B)** Die spezifische ATPase-Aktivität mit einer logarithmischen Skala am ersten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung in Gegenwart oder Abwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Verapamil. **(C)** Das Chromatogramm der Gelfiltration bei einer Wellenlänge von 280 nm am ersten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung bei Verwendung einer Superose 12 3.2/30 Säule.

Die mit Hilfe des Detergens Zwittergent 3-14 erhaltene Präparation von LmrA, deren Charakterisierung in *Abb. 3.7* gezeigt ist und bei der abweichend vom beschriebenen Protokoll zur Solubilisierung ein Volumen von 15 ml verwendet wurde, lieferte eine Proteinausbeute

von 1,2 mg. Ihre Analyse mittels Gelfiltrationschromatographie am ersten Tag nach der Reinigung ergab zwei Signale, die dem Ausschlussvolumen und einem Molekulargewicht von 380 kDa zuzuordnen waren. Weiterhin fand sich in der abfallenden Flanke des Signals bei 380 kDa eine Schulter, die einem Molekulargewicht von 120 kDa entsprach. Die erneute Gelfiltrationschromatographie am siebten Tag nach der Reinigung zeigte das Verschwinden des Signal im Ausschlussvolumen sowie eine Intensitätszunahme des Signals bei 380 kDa. Die geringe spezifische ATPase-Aktivität der Präparation von  $0,008 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  am zweiten Tag nach der Reinigung verringerte sich bis zur erneuten Bestimmung am siebten Tag leicht und zeigte keine signifikante Stimulation durch Verapamil.

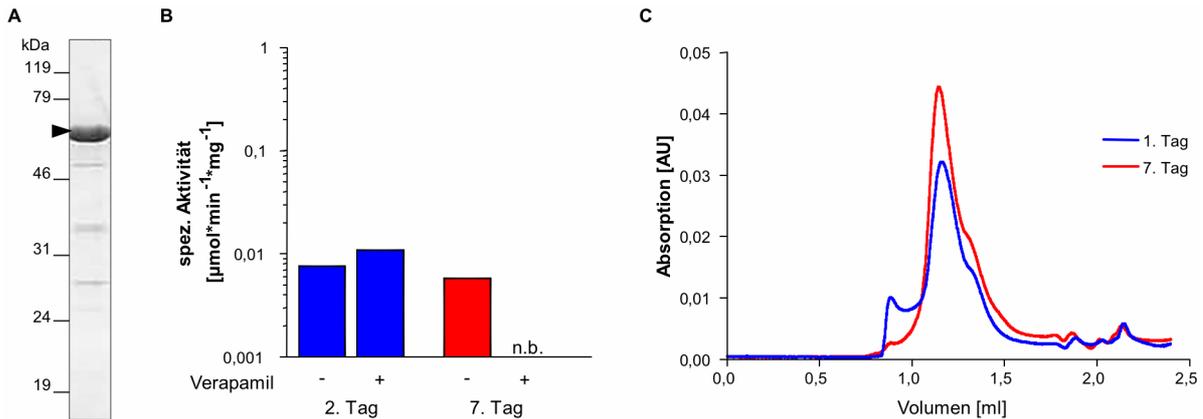


Abb. 3.7: Die Reinigung von LmrA mit Zwittergent 3-14. Zur Charakterisierung der erhaltenen Präparation wurde die Fraktion der IMAC mit der höchsten Proteinkonzentration wie folgt analysiert: **(A)** Ein 12 % SDS-PAGE für den 5  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen wurden, wobei das LmrA entsprechende Molekulargewicht durch einen Pfeil gekennzeichnet ist. **(B)** Die spezifische ATPase-Aktivität mit einer logarithmischen Skala am zweiten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung in Gegenwart oder Abwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Verapamil, wobei n.b. für nicht bestimmt steht. **(C)** Das Chromatogramm der Gelfiltration bei einer Wellenlänge von 280 nm am ersten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung bei Verwendung einer Superose 12 3.2/30 Säule.

Die unter Verwendung von Zwittergent 3-16 erhaltene Präparation (*Abb. 3.8*) ergab, bei Solubilisierung in einem Volumen von 15 ml, eine Proteinausbeute von 1,6 mg.

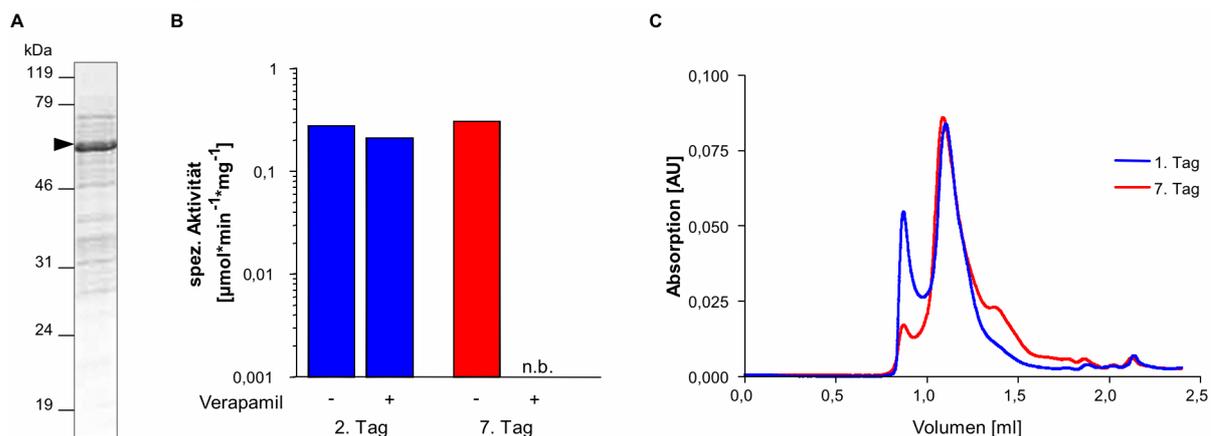
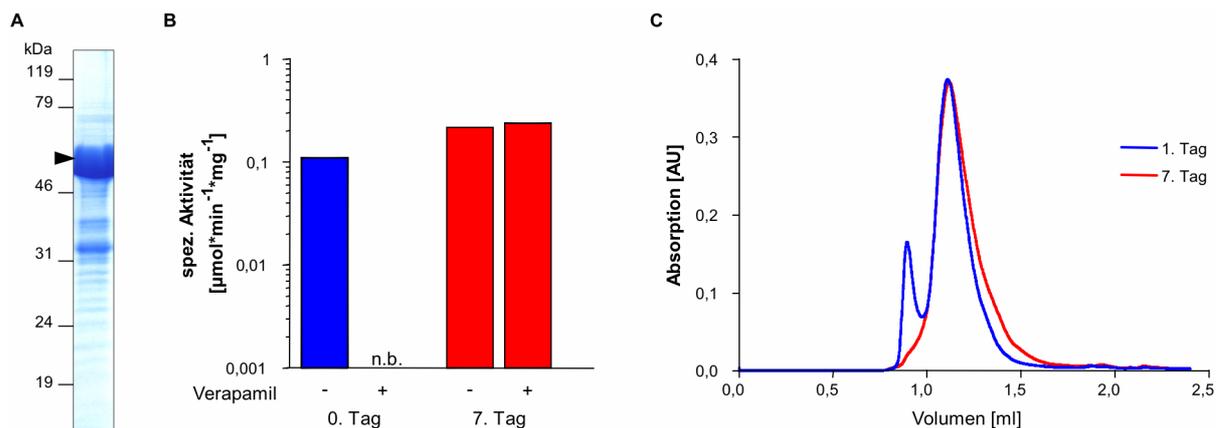


Abb. 3.8: Die Reinigung von LmrA mit Zwittergent 3-16. Zur Charakterisierung der erhaltenen Präparation wurde die Fraktion der IMAC mit der höchsten Proteinkonzentration wie folgt analysiert: **(A)** Ein 12 % SDS-PAGE für den 8  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen wurden, wobei das LmrA entsprechende Molekulargewicht durch einen Pfeil gekennzeichnet ist. **(B)** Die spezifische ATPase-Aktivität mit einer logarithmischen Skala am zweiten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung in Gegenwart oder Abwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Verapamil, wobei n.b. für nicht bestimmt steht. **(C)** Das Chromatogramm der Gelfiltration bei einer Wellenlänge von 280 nm am ersten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung bei Verwendung einer Superose 12 3.2/30 Säule.

Die Analyse der Präparation mittels Gelfiltrationschromatographie am ersten Tag nach der Reinigung lieferte zwei Signale, die dem Ausschlussvolumen und einem Molekulargewicht

von 530 kDa entsprachen. Die erneute Analyse der Präparation am siebten Tag nach der Reinigung ergab drei Signale, die dem Ausschlussvolumen sowie einem Molekulargewicht von 530 kDa und 90 kDa entsprachen, wobei die Intensität des Signals im Ausschlussvolumen im Vergleich zum ersten Tag stark abgenommen hatte. Die Bestimmung der spezifischen ATPase-Aktivität der Präparation lieferte mit einem Wert von  $0,277 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  eine der höchsten Aktivitäten aller untersuchten Protein-Detergens-Kombinationen, die auch bei Lagerung weitgehend unverändert blieb und nicht signifikant durch Verapamil stimulierbar war.

In die fünfte Gruppe von Detergenzien wurde auf Grund der Eigenschaften seiner Präparation lediglich das FOS-CHOLINE-16 eingeteilt, dessen Charakterisierung in *Abb. 3.9* dargestellt ist. Die unter seiner Verwendung erhaltene Präparation lieferte eine Proteinausbeute von 3,2 mg. Die Analyse derselben mittels Gelfiltrationschromatographie am ersten Tag nach der Reinigung zeigte zwei Signale. Diese entsprachen nach der Kalibrierung mit löslichen Proteinen dem Ausschlussvolumen und einem Molekulargewicht von 530 kDa, wobei das erste Signal eine viel geringere Intensität als das zweite besaß. Die erneute Analyse der Präparation am siebten Tag nach der Reinigung zeigte eine monodisperse Präparation mit einem Signal, das einem Molekulargewicht von 530 kDa entsprach. Die Gelfiltrationschromatographie zeigte für die unter Verwendung von FOS-CHOLINE-16 erhaltene Präparation im Vergleich zu den Vertretern der vierten Gruppe von Detergenzien eine größere Halbwertsbreite ihrer Signale. Die Bestimmung der Aktivität am Tag der Reinigung lieferte mit einem Wert von  $0,110 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  eine im Vergleich zu den anderen Protein-Detergens-Kombinationen hohe spezifische ATPase-Aktivität. Die erneute Bestimmung der Aktivität am siebten Tag nach der Reinigung ergab eine weitere Zunahme, wobei zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Stimulation durch Verapamil zu beobachten war.



*Abb. 3.9:* Die Reinigung von LmrA mit FOS-CHOLINE-16. Zur Charakterisierung der erhaltenen Präparation wurde die Fraktion der IMAC mit der höchsten Proteinkonzentration wie folgt analysiert: **(A)** Ein 12 % SDS-PAGE für den 26  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen wurden, wobei das LmrA entsprechende Molekulargewicht durch einen Pfeil gekennzeichnet ist. **(B)** Die spezifische ATPase-Aktivität mit einer logarithmischen Skala am Tag der Reinigung (blau) und am siebten (rot) Tag nach der Reinigung in Gegenwart oder Abwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Verapamil. **(C)** Das Chromatogramm der Gelfiltration bei einer Wellenlänge von 280 nm am ersten (blau) und siebten (rot) Tag nach der Reinigung bei Verwendung einer Superose 12 3.2/30 Säule.

In *Tab. 3.2* sind die Eigenschaften aller unter Verwendung der in *Tab. 3.1* dargestellten Detergenzien erhaltenen Präparationen qualitativ zusammengefasst.

| Detergens                                               | Ausbeute | Monodispersität | Aktivität |
|---------------------------------------------------------|----------|-----------------|-----------|
| 2-Carboxy- $\omega$ -heptadecenamidopropyldimethylamin  | ++       | -               | -         |
| 6-O-Methyl-n-heptylcarboxyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid | -        | --              | ++        |
| Big CHAP, deoxy                                         | -        | --              | +         |
| C-DODECAFOS                                             | ++       | -/-             | --        |
| CHAPSO                                                  | ++       | -               | -         |
| C-HEGA-11                                               | -        | --              | -         |
| CYFOS-5                                                 | ++       | +               | -         |
| CYFOS-7                                                 | +        | +               | -         |
| CYGLU-4                                                 | -        | --              | -         |
| CYMAL-5                                                 | ++       | +               | -         |
| CYMAL-7                                                 | ++       | -/+             | --        |
| Decyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                        | -        | --              | +         |
| Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                        | ++       | +               | --        |
| Dimethyldecylphosphinoxid                               | +        | --              | --        |
| Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid                         | ++       | --              | --        |
| Dodecyl-N,N-dimethylglycin                              | ++       | +               | --        |
| Dodecyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                      | -        | --              | ++        |
| Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                      | ++       | +               | -         |
| FOS-CHOLINE 12                                          | ++       | +               | -         |
| FOS-CHOLINE 14                                          | ++       | +               | -         |
| FOS-CHOLINE 16                                          | ++       | ++              | ++        |
| FOSFEN-9                                                | ++       | --              | -         |
| FOS-MEA-10                                              | -        | --              | ++        |
| FOS-MEA-12                                              | -        | --              | ++        |
| HEGA-11                                                 | ++       | --              | -         |
| Hexadecyltrimethylammonium bromid                       | -        | --              | --        |
| N,N-Dimethyl (3-carboxy-4-dodec-5-ene)amidopropylamin   | ++       | +               | -         |
| Natrium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat                  | -        | n.b.            | n.b.      |
| Natrium Cholat                                          | ++       | -               | -         |
| Natrium Dodecanoyl Sarcosine                            | +        | --              | --        |
| NP-40                                                   | ++       | -/+             | -         |
| Octaethylglycolmonododecylether                         | ++       | -               | ++        |
| Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                        | -        | --              | --        |
| Pentaethylglycolmonodecylether                          | ++       | -               | -         |
| Sucrose Monododecanoat                                  | ++       | --              | --        |
| Tetradecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid                      | +        | --              | -         |
| Tetradecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid                   | +        | -               | +         |
| Triton X-100                                            | +        | --              | --        |
| Tween 20                                                | +        | -               | ++        |
| Zwittergent 3-10                                        | +        | n.b.            | --        |
| Zwittergent 3-12                                        | ++       | n.b.            | --        |
| Zwittergent 3-14                                        | ++       | +               | --        |
| Zwittergent 3-16                                        | ++       | + / ++          | ++        |

*Tab. 3.2:* Ausbeute, Monodispersität und Aktivität von LmrA bei Reinigung mit Hilfe unterschiedlicher Detergenzien. Die Symbole in der Spalte Ausbeute entsprechen den folgenden aus den Reinigungen erhaltenen Protein-

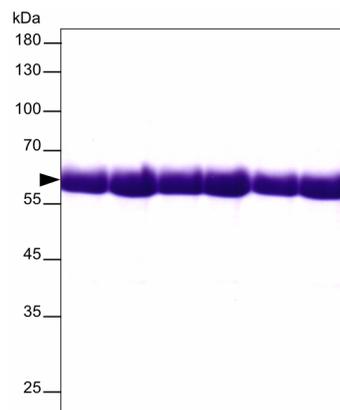
mengen bei Verwendung von Bakterien aus 5 l Kulturvolumen - : < 300 µg; + : 300 - 1000 µg; ++ : > 1000 µg. Die Symbole in der Spalte Monodispersität repräsentieren die verschiedenen Gruppen von Detergenzien, in die diese auf Basis der Eigenschaften der unter ihrer Verwendung erhaltenen Präparationen eingeteilt werden: -- : keine signifikante Proteinausbeute (Gruppe 1) oder eine Vielzahl von Signalen im Molekulargewichtsbereich von 29 kDa bis 669 kDa (Gruppe 2); - : ein Hauptsignal im Ausschlussvolumen der Superose 12 Säule (Gruppe 3); + : ein Hauptsignal außerhalb des Ausschlussvolumen der Superose 12 Säule mit einem oder mehreren weiteren Signalen (Gruppe 4); ++ : ein Signal außerhalb des Ausschlussvolumens der Superose 12 Säule (Gruppe 5). In der Spalte Aktivität entsprechen die Symbole den folgenden spezifischen ATPase-Aktivitäten -- : < 0,01 µmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup>; - : 0,01 - 0,05 µmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup>; + : 0,05 - 0,1 µmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup>; ++ : > 0,1 µmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup>.

### 3.1.3 Reinigung von LmrA aus *L. lactis*

Vor dem Hintergrund der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse wurde die unter Verwendung von FOS-CHOLINE-16 erhaltene Präparation an die Erfordernisse der Kristallisation von LmrA angepasst. Diese bestanden im Wesentlichen in der Erhöhung der Reinheit und der Steigerung der erhaltenen Proteinmenge. Eine signifikante Steigerung der Reinheit bis zur Homogenität konnte durch den Einsatz von Proteaseinhibitoren erreicht werden, nachdem ein Western Blot mit einem Anti-His-Tag-Antikörper einen signifikanten proteolytischen Abbau von LmrA nahe gelegt hatte. Die aus einer Reinigung zu gewinnende Proteinmenge wurde einerseits durch Verwendung einer größeren Menge an Bakterien als Ausgangsmaterial und andererseits durch Erhöhung der Zahl an HiTrap Chelating Säulen zur Affinitätsreinigung gesteigert. Weiterhin wurde versucht durch ein minimales Reinigungsprotokoll eine möglichst große Zahl an mit dem Membranprotein assoziierten endogenen Lipiden zu erhalten.

Im Rahmen des gewählten Reinigungsprotokolls wurden die aus einem Kulturvolumen von 15 l erhaltenen *L. lactis* mit zwei Tabletten des Proteaseinhibitors Complete EDTA free, 2 mM EDTA, 10 mg/ml Lysozym und 0,1 mg/ml DNase I versetzt, für 30 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend 10 Minuten auf Eis gekühlt. Die auf diese Weise vorbehandelten Bakterien wurden nochmals mit zwei Tabletten des Proteaseinhibitors Complete EDTA free versetzt und durch eine dreimalige Passage bei 2500 bar mittels eines auf 4°C gekühlten Zellaufschlussgerätes lysiert. Die erhaltene Suspension wurde zum Entfernen intakter Zellen und Zelltrümmer zentrifugiert (45 min; 13000 g bzw. 25000 g; 4°C) und anschließend die in Lösung verbliebenen Membranen durch Zentrifugation (60 min; 125000 g; 4°C) sedimentiert. Das erhaltene Membranpellet wurde in 5 ml Puffer 1, der mit einer Tablette des Proteaseinhibitors Complete EDTA free versetzt war, homogenisiert. Diese Suspension wurde bei einem Protein zu Detergens Verhältnis von 1,5:1 für 30 Minuten bei 4°C in Puffer 1 mit 1 % FOS-CHOLINE-16 solubilisiert und anschließend unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation (30 min; 125000 g; 4°C) sedimentiert. Die Reinigung von LmrA aus dem Überstand erfolgte mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie unter Verwendung seines amino-terminalen „Hexahistidin-Tag“ bei 4°C. Im Anschluss wurden die Protein enthaltenden Fraktionen vereinigt und mit Hilfe eines Amicon Ultra 15 Konzentrators mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von 100 kDa auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml konzentriert. Die gewonnene Proteinlösung wurde in einem Dispo Dialyzer zweimal gegen Puffer 4 mit 0,001325 % FOS-CHOLINE-16 dialysiert und durch einen Spin-X Filter zentrifugiert.

Das beschriebene Reinigungsprotokoll erlaubte es, wie der SDS-PAGE in *Abb. 3.10* zeigt, LmrA in einem Schritt zur Homogenität zu reinigen, wobei in der Regel 0,7 – 1,0 mg stabiles und monodisperses LmrA pro Liter Kulturvolumen erhalten wurden. Das Reinigungsprotokoll liefert somit für strukturelle Untersuchungen von LmrA ausreichende Mengen einer reinen, monodispersen und stabilen Proteinlösung. Es stellt somit in jeglicher Hinsicht eine deutliche Verbesserung gegenüber dem veröffentlichten Reinigungsprotokoll (Margolles et al., 1999) dar und bildet einen optimalen Ausgangspunkt für die strukturelle Charakterisierung von LmrA.



*Abb. 3.10:* SDS-PAGE verschiedener LmrA Fraktionen aus der IMAC. Gezeigt ist ein 10 % SDS-PAGE, für den in jeder Spur zwischen 12 und 15  $\mu\text{g}$  gereinigtes Protein aufgetragen wurden. Weiterhin sind die Banden des Molekulargewichtsmarkers und das Molekulargewicht von LmrA (Pfeil) gekennzeichnet.

### 3.1.4 Kristallisation

Die Suche nach Bedingungen zur Kristallisation von LmrA erfolgte in der Regel unter Verwendung der im vorherigen Abschnitt beschriebenen reinen, monodispersen und stabilen Präparation mit Hilfe von Dampfdiffusionsexperimenten nach der Methode des hängenden Tropfens. Für die Kristallisationsexperimente in 96-Well Crystalquick Platten (Greiner Bio-One), die normalerweise parallel bei einer Temperatur von 4°C und 22°C erfolgten, wurden in der Regel 1  $\mu\text{l}$  Proteinlösung und 1  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Reservoirlösung verwendet. Im Interesse einer breit angelegten Analyse des n-dimensionalen Kristallisationsraums von LmrA wurden in Bezug auf die Kristallisationslösungen zwei unterschiedliche Wege beschritten. Einerseits erfolgte die Kristallisation unter Verwendung der kommerziell erhältlichen „sparse matrix screens“ MembFac (Hampton Research), The MbClass (Nextal), The MbClass2 (Nextal) und MemStart & MemSys (Molecular Dimensions), die jeweils aus einer Vielzahl erfolgreich zur Kristallisation von Membranproteinen eingesetzter Lösungen bestehen. Andererseits wurden in einem systematischeren Ansatz 22 selbst entwickelte „grid screens“ verwendet, die in *Tab. 3.3* wiedergegeben sind und deren Entwicklung auf einer Analyse der Kristallisationsbedingungen von Membranproteinen ([www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html](http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html)) basierte.

| Fällungsmittel  | Konzentrationen                                              | Salz              | Konzentration |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|-------------------|---------------|
| MPD             | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | MgSO <sub>4</sub> | 100 mM        |
| MPD             | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | NaCl              | 200 mM        |
| PEG 400         | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | CaCl <sub>2</sub> | 200 mM        |
| PEG 400         | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | LiSO <sub>4</sub> | 100 mM        |
| PEG 400         | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | MgCl <sub>2</sub> | 150 mM        |
| PEG 400         | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | MgNO <sub>3</sub> | 200 mM        |
| PEG 400         | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | MgSO <sub>4</sub> | 100 mM        |
| PEG 400         | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | Na Malonat        | 100 mM        |
| PEG 400         | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | NaCl              | 200 mM        |
| PEG 400         | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | Na/K Tartrat      | 150 mM        |
| PEG 550 MME     | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | MgSO <sub>4</sub> | 100 mM        |
| PEG 550 MME     | 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54 % (v/v)        | NaCl              | 200 mM        |
| PEG 1500        | 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36 % (w/v)         | MgSO <sub>4</sub> | 100 mM        |
| PEG 1500        | 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36 % (w/v)         | NaCl              | 200 mM        |
| PEG 3350        | 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36 % (w/v)         | MgSO <sub>4</sub> | 100 mM        |
| PEG 3350        | 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36 % (w/v)         | NaCl              | 200 mM        |
| PEG 8000        | 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 26, 30, 34 % (w/v)          | MgSO <sub>4</sub> | 100 mM        |
| PEG 8000        | 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 26, 30, 34 % (w/v)          | NaCl              | 200 mM        |
| PEP 426         | 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36 % (v/v)         | MgSO <sub>4</sub> | 150 mM        |
| Ammoniumsulfat  | 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 0,3; 0,7; 1,5 M |                   |               |
| Natrium Malonat | 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 0,3; 0,8; 1,5 M |                   |               |
| Magnesiumsulfat | 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1; 2,5; 0,3; 0,6; 0,9; 1,5 M |                   |               |

Tab. 3.3: Selbst entwickelte „grid screens“ zur Kristallisation von LmrA. Die aus je 96 Lösungen bestehenden „grid screens“, die aus einer zweidimensionalen Matrix der Fällungsmittelkonzentration gegen den pH-Wert der Lösung bestanden, besaßen die allgemeine Zusammensetzung 100 mM Puffer, x Fällungsmittel, y Salz, wobei x und y die angegebenen Konzentrationen des Fällungsmittels bzw. des Salzes repräsentieren. Die in den einzelnen „grid screens“ verwendeten Pufferlösungen waren Natrium Acetat pH 4, Natrium Citrat pH 5, MES pH 6, PIPES pH 7, TRIS pH 8, Bicine pH 9, CAPSO pH 10 und CAPS pH 11. Die kursiv dargestellten Konzentrationen der Fällungsmittel wurden zusätzlich mit 3 % PEG 400 versetzt.

Insgesamt wurden bei der Suche nach Kristallisationsbedingungen von LmrA 9600 Bedingungen analysiert. Diese umfangreiche Analyse des n-dimensionalen Kristallisationsraums von LmrA ergab anfänglich drei Kristallformen.

|                      | Kristallform 1                                                       | Kristallform 2                            | Kristallform 3                                                          | Kristallform 4                                                      |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Reservoirlösung      | 100 mM Natrium Citrat pH 5,6;<br>100 mM Magnesiumchlorid;<br>4 % MPD | 300 mM Natrium Citrat pH 5,6;<br>30 % MPD | 50 mM Natrium Citrat pH 5,6;<br>150 mM Natriumchlorid;<br>10 % PEG 3350 | 100 mM Natrium Citrat pH 5,6;<br>100 mM Natriumchlorid;<br>22 % MPD |
| Temperatur           | 4°C                                                                  | 4°C                                       | 4°C                                                                     | 22°C                                                                |
| Proteinkonzentration | 7 mg/ml                                                              | 6 mg/ml                                   | 6 mg/ml                                                                 | 7 mg/ml                                                             |
| Protein: Reservoir   | 1:1                                                                  | 1:1                                       | 1:1                                                                     | 1:1                                                                 |
| Tropfenvolumen       | 2 µl                                                                 | 2 µl                                      | 2 µl                                                                    | 2 µl                                                                |

Tab. 3.4: Kristallisationsbedingungen der vier Kristallformen von LmrA.

Die Kristalle der ersten Kristallform entwickelten sich unter Verwendung von Lösung Nummer 17 (100 mM Tri-Natrium Citrat pH 5,6; 100 mM Magnesiumchlorid; 4 % MPD) des „sparse matrix screen“ The MbClass bei einer Temperatur von 4°C und einer Proteinkonzentration von 7 mg/ml. Die Bildung der Kristalle erfolgte nach einem Zeitraum von sechs Tagen. Die Kristalle der zweiten Kristallform bildeten sich ebenfalls innerhalb von sechs Tagen unter

Verwendung der Lösung Nummer 26 (300 mM Tri-Natrium Citrat pH 5,6; 30 % MPD) des The MbClass bei einer Temperatur von 4°C und einer Proteinkonzentration von 6 mg/ml. Die dritte Kristallform wurde unter Verwendung von Lösung Nummer 57 (50 mM Tri-Natrium Citrat pH 5,6; 150 mM Natriumchlorid; 10 % PEG 3350) des The MbClass bei einer Temperatur von 4°C und einer Proteinkonzentration von 6 mg/ml erhalten, wobei ihre Bildung etwa zwei Monaten benötigte.

Eine vierte Kristallform fand sich bei Verwendung von weiteren selbst entwickelten „grid screens“, die Tri-Natrium Citrat pH 5,6 als Puffer verwendeten. Die Grundlage hierfür bildete die Beobachtung, dass die Reservoirlösungen (siehe Tab. 3.4) der ersten drei Kristallformen diesen Puffer enthielten. Die Kristalle der vierten Kristallform bildeten sich unter Verwendung einer Reservoirlösung, die aus 100 mM Tri-Natrium Citrat pH 5,6; 100 mM Natriumchlorid und 22 % MPD bestand, bei einer Temperatur von 22°C sowie einer Proteinkonzentration von 7 mg/ml nach einem Zeitraum von fünf Tagen.

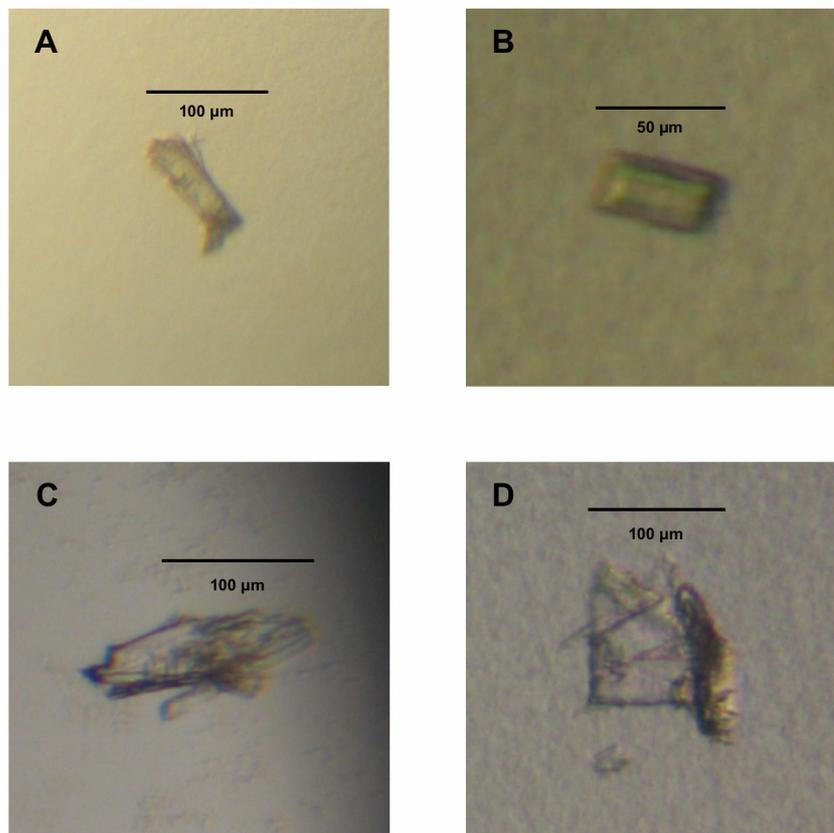


Abb. 3.11: Kristalle von LmrA. Gezeigt sind typische Kristalle (A) der Kristallform 1, (B) der Kristallform 2, (C) der Kristallform 3 und (D) der Kristallform 4.

Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden die Konzentrationen der entsprechenden Fällungsmittel und Salze sowie der pH-Wert der zur Kristallisation verwendeten Reservoirlösungen – parallel bei einer Temperatur von 4°C und 22°C – in einer breit angelegten Analyse engmaschig variiert. Weiterhin erfolgte eine Änderung des Mischungsverhältnisses der Protein- mit der Reservoirlösung. Es gelang jedoch trotz der intensiven in dieser Richtung unternommenen Bemühungen nicht, die schlechte Reproduzierbarkeit der Kristallbildung für die in Tab. 3.4 aufgeführten Kristallisationsbedingungen zu verbessern.

| Kristallform 1                                                               | Kristallform 3                                                                                        | Kristallform 4                                                             |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 100 mM Natrium Citrat pH 5,6;<br>100 mM Magnesiumchlorid;<br>20 % (v/v) MPD; | 50 mM Natrium Citrat pH 5,6;<br>150 mM Natriumchlorid;<br>20 % (w/v) PEG 3350;<br>30 % (v/v) PEG 400; | 100 mM Natrium Citrat pH 5,6;<br>100 mM Natriumchlorid;<br>33 % (v/v) MPD; |
| 0,001325 % (w/v) FOS-CHOLINE-16                                              | 0,001325 % (w/v) FOS-CHOLINE-16                                                                       | 0,001325 % (w/v) FOS-CHOLINE-16                                            |

Tab. 3.5: kryoprotektive Puffer der unterschiedlichen Kristallformen.

Für die Datenaufnahme wurden die Kristalle auf Grund ihrer geringen Größe von etwa 50  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$  in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierfür wurden die Kristalle der Kristallform 2 mit einer Nylonschleufe direkt aus dem Kristallisationsansatz in flüssigen Stickstoff überführt und in diesem gelagert. Im Unterschied dazu wurden die Kristalle der anderen Kristallformen mit einer Nylonschleufe in die entsprechenden in Tab. 3.5 gezeigten kryoprotektiven Puffer überführt, dort für 10 bis 15 Sekunden inkubiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in diesem bis zur Datenaufnahme gelagert. Hierbei erfolgte auf Grund der limitierten Zahl an Kristallen keine Untersuchung verschiedener kryoprotektiver Puffer.

Die Datenaufnahme an den eingefrorenen Kristallen in einem Strahl aus tiefkaltem Stickstoff nach der Oszillationsmethode am Messplatz BW6 der Max-Planck-Gruppen für Strukturelle Molekularbiologie am Deutschen Elektronen Synchrotron ergab bei geeigneten Parametern für keine der vier Kristallformen ein Beugungsbild, das auf Salz- oder Detergenkristalle schließen ließ. Die weitere Aufnahme von Beugungsdaten mit angepassten Parametern zeigte für die Kristallform 2 eine schwache Streuung bis zu einer Auflösung von ungefähr 20  $\text{\AA}$ , die auf Proteinkristalle hindeutet.

## 3.2 Das Substratbindeprotein EhuB

### 3.2.1 Kristallisation

Die Suche nach Kristallisationsbedingungen für den Komplex von EhuB mit einem seiner Substrate Ectoin (Abb. 3.12A) oder Hydroxyectoin (Abb. 3.12B) erfolgte in einem Dampfdiffusionsaufbau mit einem hängenden Tropfen unter Verwendung der kommerziell erhältlichen „sparse matrix screens“ Crystal Screen I und II bei einer Temperatur von 4°C.

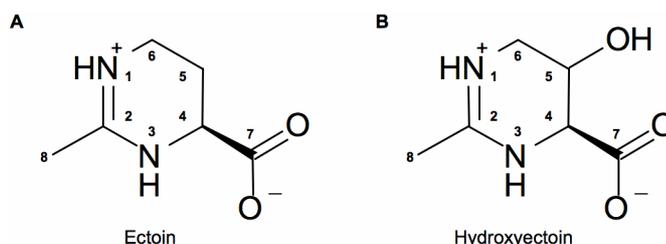


Abb. 3.12: Die Strukturen von (A) Ectoin und (B) Hydroxyectoin.

Für die Kristallisation des Komplexes von EhuB mit einem seiner Substrate wurde die von der Arbeitsgruppe von Prof. E. Bremer (Universität Marburg) bereitgestellte konzentrierte Proteinlösung auf eine Endkonzentration von 1 mM des entsprechenden Substrats eingestellt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Kristallisation von 1 µl der Proteinlösung und 1 µl der entsprechenden Reservoirlösung in einer 96-Well Crystalquick Platte (Greiner Bio-One) bei einer Temperatur von 4°C.

Die Suche nach Kristallisationsbedingungen für den Komplex von EhuB mit einem seiner Substrate Ectoin bzw. Hydroxyectoin lieferte für beide unter Verwendung der Lösung Nummer 12 (100 mM Natrium Acetat pH 4,6; 100 mM Cadmiumchlorid; 30 % (v/v) Polyethylenglykol 400) des Crystal Screen II nadelförmige Kristalle, die für den Komplex mit Ectoin in Abb. 3.13A gezeigt sind. Die beschriebene Reservoirlösung bildete im Folgenden den Ausgangspunkt für eine weitere Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen, bei der unter anderem mit Hilfe von auf den erhaltenen Bedingungen aufbauenden „grid screens“, die Konzentrationen unterschiedlicher Fällungsmittel gegen den pH-Wert der Lösung variiert wurden. Die in diesem Zusammenhang verwendeten „grid screens“ sind in Tab. 3.6 gezeigt.

| Fällungsmittel | Konzentrationen            |
|----------------|----------------------------|
| MPD            | 22, 26, 30, 34 % (v/v)     |
| PEG 400        | 28, 30, 32, 34 % (v/v)     |
| PEG 1500       | 16, 20, 24, 26, 30 % (w/v) |
| PEG 4000       | 14, 18, 22, 26, 30 % (w/v) |
| PEG 5000 MME   | 14, 18, 22, 26, 30 % (w/v) |
| PEG 8000       | 10, 14, 18, 22, 26 % (w/v) |

Tab. 3.6: „grid screens“ zur Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen von EhuB. Die „grid screens“, die aus einer zweidimensionalen Matrix der Fällungsmittelkonzentration gegen den pH-Wert der Lösung bestanden, besaßen die allgemeine Zusammensetzung: 100 mM Pufferlösung, 100 mM Cadmiumchlorid, x % Fällungsmittel, wobei x die angegebenen Konzentrationen der Fällungsmittel repräsentiert. Die in den einzelnen „grid screens“ verwendeten Pufferlösungen waren Natrium Citrat Lösungen mit den pH-Werten 2,5; 3,0 und 3,5 sowie Natrium Acetat Lösungen mit den pH-Werten 4,0 und 5,0.

Die Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen mit Hilfe der in *Tab. 3.6* gezeigten „grid screens“ lieferte unter zahlreichen Bedingungen nadelförmige Kristalle unterschiedlicher Zahl und Größe. Das mit Abstand beste Resultat in Bezug auf die Größe der erhaltenen Kristalle wurde – sowohl für den Komplex von EhuB mit Ectoin wie auch Hydroxyectoin – unter Verwendung einer aus 100 mM Natrium Acetat pH 4,0; 100 mM Cadmiumchlorid und 14 % PEG 5000 MME bestehenden Reservoirlösung erhalten. Der Versuch einer weiteren Verfeinerung dieser Kristallisationsbedingung unter Verwendung des Additive Screen (Hampton Research) ergab keine weitere Verbesserung. Im Gegenteil verhinderten die meisten untersuchten Zusätze die Kristallbildung oder führten zu kleineren Kristallen.

| Parameter            | Bedingungen                                                                |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Reservoirlösung      | 100 mM Natrium Acetat pH 4,0<br>100 mM Cadmiumchlorid<br>14 % PEG 5000 MME |
| Temperatur           | 4°C                                                                        |
| Proteinkonzentration | 10 – 40 mg/ml in 10 mM Tris pH 7,0                                         |
| Protein:Reservoir    | 1:1                                                                        |
| Tropfenvolumen       | 2 µl                                                                       |

Tab. 3.7: Kristallisationsbedingungen für den Komplex von EhuB mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin.

In *Tab. 3.7* sind die für den Komplex von EhuB mit einem seiner Substrate Ectoin bzw. Hydroxyectoin erhaltenen verfeinerten Kristallisationsbedingungen gezeigt. Die Bildung der Kristalle setzte unter diesen Bedingungen nach 2 bis 4 Wochen ein und die Kristalle setzten ihr Wachstum über einen Zeitraum von etwa 2 Wochen fort. In *Abb. 3.13C-D* sind typische für den Komplex von EhuB mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin erhaltene Kristalle dargestellt.

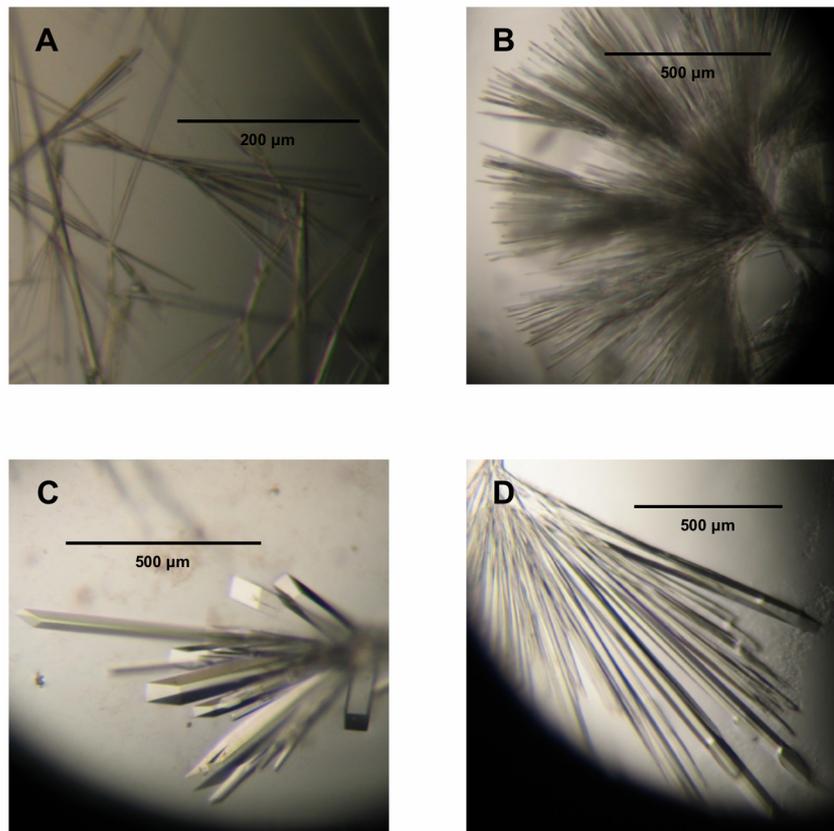


Abb. 3.13: Kristalle von EhuB. Gezeigt sind (A) die unter Verwendung von Lösung Nummer 12 des Crystal Screen II gewachsenen Kristalle von EhuB im Komplex mit Ectoin. (B) Die im Zuge der Optimierung der Kristallisationsbedingungen von EhuB erhaltenen Büschel von Nadeln. (C) Typische zur Aufnahme von Beugungsdaten verwendete Kristalle von EhuB im Komplex mit Ectoin. (D) Typische Kristalle von EhuB mit gebundenem Hydroxyectoin.

### 3.2.2 Datenaufnahme und Prozessierung

Die Kristalle von EhuB im Komplex mit einem seiner Substrate Ectoin bzw. Hydroxyectoin wurden zur Verringerung der im Zuge der Datenaufnahme entstehenden Strahlenschäden in einem geeigneten kryoprotektiven Puffer eingefroren. Hierfür wurden die in Abb. 3.13 beispielhaft gezeigten zusammengewachsenen Kristalle mit Hilfe von „Micro-Tools“ (Hampton Research) voneinander getrennt. Anschließend wurde ein einzelner Kristall mit einer Nylonschleife in den entsprechenden in Tab. 3.8 angegebenen kryoprotektiven Puffer überführt, dort für 20 bis 30 Sekunden inkubiert und in flüssigem Stickstoff oder einem tiefkalten Stickstoffstrahl eingefroren. Die optimale Zusammensetzung der kryoprotektiven Puffer wurde auf empirischem Weg auf Basis der Kristallisationslösung unter Zusatz einer Substanz mit kryoprotektiver Wirkung an EhuB Kristallen bestimmt.

| EhuB im Komplex mit Ectoin   | EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin |
|------------------------------|-----------------------------------|
| 100 mM Natrium Acetat pH 4,0 | 100 mM Natrium Acetat pH 4,0      |
| 100 mM Cadmiumchlorid        | 100 mM Cadmiumchlorid             |
| 21 % (w/v) PEG 5000 MME      | 30 % (w/v) PEG 5000 MME           |
| 20 % Ethylenglykol           | 20 % Ethylenglykol                |

Tab. 3.8: Kryoprotektive Puffer für die Kristalle von EhuB im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin.

Die Datenaufnahme an den eingefrorenen Kristallen von EhuB im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin erfolgte nach der Oszillationsmethode bei einer Temperatur von 100 K am Messplatz BW6 der Max-Planck-Gruppen für Strukturelle Molekularbiologie am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 1,05 Å. Die in diesem Rahmen gewonnenen Beugungsbilder der einzelnen Datensätze wurden mit Hilfe der Programme der HKL-Suite (Otwinowski und Minor, 1997) indiziert, integriert und skaliert.

Die Prozessierung der erhaltenen Daten zeigte, dass die Kristalle von EhuB im Komplex mit Ectoin wie auch Hydroxyectoin der tetragonalen Raumgruppe  $P4_32_12$  angehören und eine Einheitszelle mit Dimensionen von  $a = 57,3$  Å,  $b = 57,3$  Å und  $c = 161,9$  Å sowie Winkeln  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  besaßen. Aus diesen Werten ergibt sich für die Kristalle von EhuB im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin ein Matthews Koeffizient von  $V_M = 2,45$  Å<sup>3</sup>/Da, was einem Lösungsmittelanteil von 50 % bei einem Monomer mit einem Molekulargewicht von 27 kDa pro asymmetrischer Einheit entspricht.

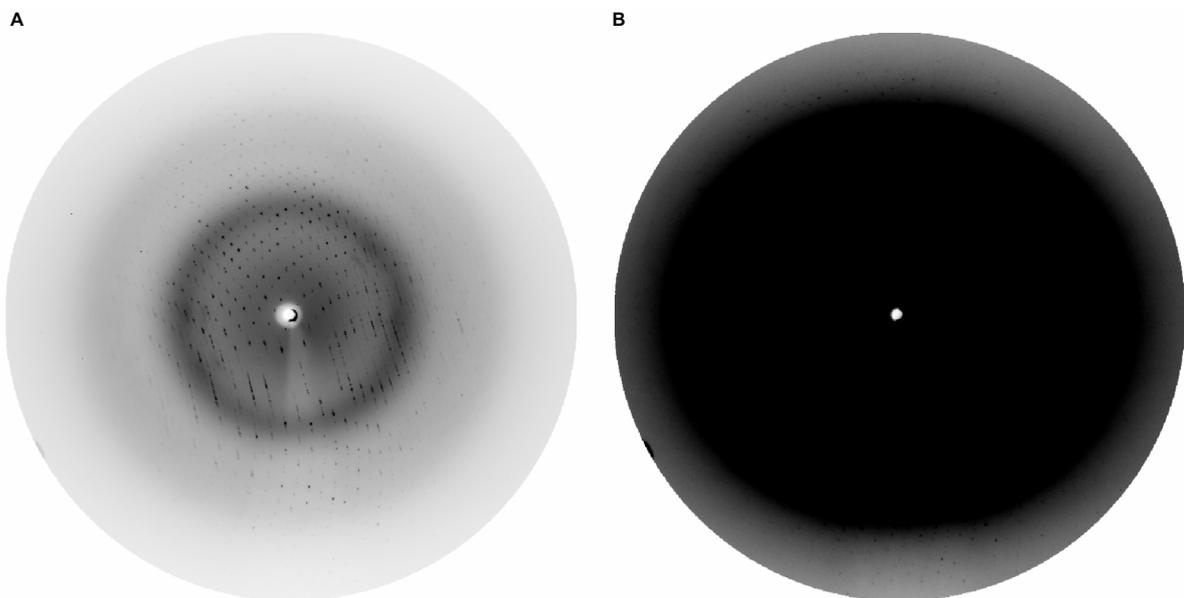


Abb. 3.14: Beugungsbild eines nativen Kristalls von EhuB im Komplex mit Ectoin. Dargestellt sind die Reflexe bei (A) niedriger bis mittlerer Auflösung und (B) hoher Auflösung. Die Datenaufnahme erfolgte am Messplatz BW-6 der Max-Planck-Gruppen für Strukturelle Molekularbiologie bei einer Wellenlänge von 1,05 Å. Der Rand des Beugungsbildes entspricht einer Auflösung von 1,6 Å.

Die Datenaufnahme und Prozessierung lieferte für den Komplex von EhuB mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin einen zu 97,6 % bzw. 95,4 % vollständigen Datensatz mit einer Auflösung von 1,8 Å bzw. 2,3 Å. Die Datensätze für den Komplex von EhuB mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin hatten ein Signal zu Rauschen Verhältnis von 11,0 bzw. 13,6 und besaßen einen  $R_{\text{sym}}$  Wert von 11,9 % bzw. 5,7 %.

Eine Zusammenfassung der Kristallparameter und Datenaufnahmestatistiken ist in *Tab. 3.9* gezeigt.

| Ligand                                 | Ectoin                           | Hydroxyectoin                    |
|----------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <i>Kristallparameter bei 100 K</i>     |                                  |                                  |
| Raumgruppe                             | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 |
| Zellkonstanten                         |                                  |                                  |
| a (Å)                                  | 57,365                           | 57,132                           |
| b (Å)                                  | 57,366                           | 57,132                           |
| c (Å)                                  | 161,883                          | 161,484                          |
| α, β, γ                                | 90°                              | 90°                              |
| <i>Datenaufnahme und Prozessierung</i> |                                  |                                  |
| Wellenlänge                            | 1,05 Å                           | 1,05 Å                           |
| Auflösung (Å)                          | 20 – 1,8 (1,83 – 1,80)           | 60 – 2,3 (2,34 – 2,30)           |
| „mean redundancy“                      | 3,5                              | 2,5                              |
| Zahl der Reflexe                       | 88264                            | 30290                            |
| „unique reflections“                   | 25416                            | 12078                            |
| Vollständigkeit (%) <sup>a</sup>       | 97,6 (98,3)                      | 95,4 (96,1)                      |
| I/σ(I) <sup>a</sup>                    | 11,0 (1,7)                       | 13,6 (4,7)                       |
| R <sub>sym</sub> (%) <sup>a,b</sup>    | 11,9 (89,3)                      | 5,7 (20,1)                       |

*Tab. 3.9:* Kristallparameter und Datenaufnahmestatistiken der nativen Kristalle von EhuB. Die Kristallparameter und Statistiken der Datensätze wurden unter Verwendung von SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) erstellt.

<sup>a</sup> Die Zahlen in Klammern geben die Werte für die letzte Auflösungsstufe (siehe Auflösung) an.

<sup>b</sup>  $R_{sym} = \frac{\sum \sum |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum \sum I_i(hkl)}$ , wobei  $I_i(hkl)$  die beobachtete Intensität des Reflexes  $(hkl)$  und  $\langle I(hkl) \rangle$  die gemittelte Intensität der  $i$  Beobachtungen des Reflexes  $(hkl)$  darstellen.

### 3.2.3 Das Phasenproblem

Die Bestimmung der Phasenwinkel der experimentell ermittelten Strukturfaktoren stellt ein zentrales Problem der Röntgenstrukturanalyse von Proteinen dar, da diese zur Berechnung der Elektronendichte und somit zur Strukturbestimmung benötigt werden, jedoch nicht direkt aus dem Beugungsbild zu erhalten sind. Für Proteine stehen zur Lösung dieses Problems im Wesentlichen drei Verfahren zur Verfügung:

- „Multiple Isomorphous Replacement“ (MIR)
- „Multiple wavelength Anomalous Dispersion“ (MAD)
- „Molecular Replacement“ (MR)

Die Bestimmung der Phasenwinkel der Strukturfaktoren von EhuB wurde anfänglich unter Zuhilfenahme des MR mit den ebenfalls kompatible Solute bindenden Substratbindeproteinen ProX aus *E. coli* (Proteindatenbank Zugangscode 1R9L) und OpuAC aus *B. subtilis* (Proteindatenbank Zugangscode 2B4L) als Suchmodell angegangen. Aus beiden Modellen wurden die Liganden und Wassermoleküle entfernt und diese dann für ein MR unter Einsatz des Programms AMoRe (Navaza, 1994) aus der CCP4 Suite verwendet. Das MR lieferte jedoch trotz

der Wahl unterschiedlicher Auflösungsbereiche weder für die vollständigen Proteine noch für isolierte Domänen der beiden Suchmodelle eine eindeutige Lösung.

Aus diesem Grund erfolgte die Suche nach Kristallisationsbedingungen für den Komplex von Selenomethionin-markiertem EhuB und seinem Substrat Ectoin mit dem Ziel das Phasenproblem mit Hilfe der MAD (Hendrickson et al., 1990; Hendrickson et al., 1988; Murthy et al., 1988) zu lösen. Die Suche nach Bedingungen zur Kristallisation des Selenomethionin-markierten Proteins erfolgte – analog zum nativen Protein – mit Hilfe der in *Tab. 3.6* gezeigten „grid screens“. Das mit Abstand beste Resultat in Bezug auf die Größe der erhaltenen Kristalle wurde unter Verwendung einer aus 100 mM Natrium Acetat pH 4,0; 100 mM Cadmiumchlorid und 22 % PEG 5000 MME bestehenden Reservoirlösung erhalten. Die für den Komplex von Selenomethionin-markiertem EhuB und seinem Substrat Ectoin ermittelten Kristallisationsbedingungen sind in *Tab. 3.10* zusammengefasst.

| Parameter            | Bedingungen                                                                |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Reservoirlösung      | 100 mM Natrium Acetat pH 4,0<br>100 mM Cadmiumchlorid<br>22 % PEG 5000 MME |
| Temperatur           | 4°C                                                                        |
| Proteinkonzentration | 7 mg/ml in 10 mM Tris pH 7,0                                               |
| Protein:Reservoir    | 1:1                                                                        |
| Tropfenvolumen       | 2 µl                                                                       |

*Tab. 3.10:* Kristallisationsbedingungen für den Komplex von Selenomethionin-markiertem EhuB mit Ectoin.

Die Kristalle des Komplexes von Selenomethionin-markiertem EhuB mit Ectoin wurden zur Verringerung der im Zuge der Datenaufnahme entstehenden Strahlenschäden in einem geeigneten kryoprotektiven Puffer eingefroren. Zu diesem Zweck wurden die zusammengewachsenen Kristalle mit Hilfe von „Micro-Tools“ voneinander getrennt und ein einzelner Kristall mit einer Nylonschleife in den in *Tab. 3.11* beschriebenen kryoprotektiven Puffer überführt, dort für 20 bis 30 Sekunden inkubiert und in einem tiefkalten Stickstoffstrahl eingefroren. Die Zusammensetzung des verwendeten kryoprotektiven Puffers wurde auf empirischem Weg bestimmt.

|                              |
|------------------------------|
| 100 mM Natrium Acetat pH 4,0 |
| 100 mM Cadmiumchlorid        |
| 30 % (w/v) PEG 5000 MME      |
| 20 % Ethylenglykol           |

*Tab. 3.11:* Kryoprotektiver Puffer für die Kristalle von Selenomethionin-markiertem EhuB im Komplex mit Ectoin.

Die Datenaufnahme an einem eingefrorenen Kristall von Selenomethionin-markiertem EhuB im Komplex mit Ectoin wurde nach der Oszillationsmethode bei einer Temperatur von 100 K am Messplatz BW6 der Max-Planck-Gruppen für Strukturelle Molekularbiologie am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY, Hamburg) durchgeführt. Zur Bestimmung der Phasenwinkel der Strukturaktoren mittels MAD erfolgte die Datenaufnahme bei Wellenlängen von 0,9791 Å (Inflection), 0,9787 Å (Maximum) und 0,95 Å (Remote). Die entsprechenden

Beugungsbilder der einzelnen Datensätze wurden mit Hilfe der Programme der HKL-Suite indiziert, integriert und skaliert.

Die Aufnahme und Prozessierung der Beugungsbilder der als „Inflection“, „Maximum“ und „Remote“ bezeichneten Datensätze ergab bei einer Auflösung von 2,1 Å eine Vollständigkeit von 99,2 %, 98,6 % sowie 99,7 %, ein Signal zu Rausch Verhältnis von 28, 30 und 28 und einen  $R_{\text{sym}}$  Wert von 8,4 %, 9,4 % und 8,8 %. Eine Zusammenfassung der Kristallparameter und Datenaufnahmestatistiken des Kristalls von Selenomethionin-markiertem EhuB im Komplex mit Ectoin findet sich in *Tab. 3.12*.

| Datensatz                              | Inflection <sup>b</sup>          | Maximum <sup>b</sup>             | Remote <sup>b</sup>              |
|----------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <i>Kristallparameter bei 100 K</i>     |                                  |                                  |                                  |
| Raumgruppe                             | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 |
| Zellkonstanten                         |                                  |                                  |                                  |
| a (Å)                                  | 57,300                           | 57,300                           | 57,300                           |
| b (Å)                                  | 57,300                           | 57,300                           | 57,300                           |
| c (Å)                                  | 161,900                          | 161,900                          | 161,900                          |
| $\alpha, \beta, \gamma$                | 90°                              | 90°                              | 90°                              |
| <i>Datenaufnahme und Prozessierung</i> |                                  |                                  |                                  |
| Wellenlänge                            | 0,9791 Å                         | 0,9787 Å                         | 0,95 Å                           |
| Auflösung (Å)                          | 99-2,1 (2,13-2,10)               | 99-2,1 (2,13-2,10)               | 99-2,1 (2,13-2,10)               |
| „mean redundancy“                      | 6,9                              | 7,3                              | 6,9                              |
| Zahl der Reflexe                       | 123187                           | 129923                           | 125104                           |
| „unique reflections“                   | 17942                            | 17914                            | 18078                            |
| Vollständigkeit (%) <sup>a</sup>       | 99,2 (99,7)                      | 98,6 (99,7)                      | 99,7 (99,7)                      |
| $I/\sigma(I)$ <sup>a</sup>             | 28 (6,7)                         | 30 (7,5)                         | 28 (6,3)                         |
| $R_{\text{sym}}$ (%) <sup>a,c</sup>    | 8,4 (31,5)                       | 9,4 (30,2)                       | 8,8 (33,6)                       |

*Tab. 3.12:* Kristallparameter und Datenaufnahmestatistiken des Kristalls von Selenomethionin-markiertem EhuB im Komplex mit Ectoin. Die Kristallparameter und Statistiken wurden unter Verwendung von SCALEPACK erstellt.

<sup>a</sup> Die Zahlen in Klammern geben die Werte für die letzte Auflösungsschale (siehe Auflösung) an.

<sup>b</sup> Die Datensätze wurden an einem einzelnen Kristall aus Selenomethionin-markiertem EhuB im Komplex mit Ectoin aufgenommen.

<sup>c</sup>  $R_{\text{sym}} = \frac{\sum \sum |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum \sum I_i(hkl)}$ , wobei  $I_i(hkl)$  die beobachtete Intensität des Reflexes  $(hkl)$  und  $\langle I(hkl) \rangle$  die gemittelte Intensität der  $i$  Beobachtungen des Reflexes  $(hkl)$  darstellen.

### 3.2.4 Strukturbestimmung von EhuB im Komplex mit Ectoin

Die Bestimmung der Phasenwinkel der Strukturfaktoren erfolgte mit Hilfe der drei hierfür bei unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommenen Datensätze mittels MAD. Zu diesem Zweck wurden aus den drei beschriebenen Datensätzen unter Verwendung von SOLVE (Terwilliger und Berendzen, 1999) die Positionen von vier der fünf im Selenomethionin-markierten EhuB vorhandenen Selenatome bestimmt und mit ihrer Hilfe die Phasenwinkel der Strukturfaktoren sowie die Elektronendichte berechnet. Die ermittelte Elektronendichte wurde mit dem Programm RESOLVE (Terwilliger, 2000) mittels statistischer Dichtemodifikation verbessert und zur automatischen Erzeugung von etwa 80 % des Modells verwendet. Im Anschluss an die

visuelle Kontrolle des automatisch erstellten Modells in O (Jones et al., 1991) wurden die noch fehlenden Teile mit Ausnahme einiger Reste am N-Terminus des Proteins anhand von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten manuell eingefügt. Das resultierende Strukturmodell des Proteins enthielt die Reste 8 bis 256 der 256 Reste von EhuB. Dieses entspricht den Resten 22 bis 270 des zur Kristallisation verwendeten rekombinanten Proteins, das am N-Terminus zusätzlich 14 Reste eines in der Elektronendichte nicht sichtbaren „Strep-Tag“ sowie einer Faktor Xa Schnittstelle besitzt. Im Rahmen dieser Arbeit wird zur Bezeichnung der Reste die Zählweise des nativen Proteins verwendet.

Die Verfeinerung der atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des Modells mit einer Auflösung von 2,1 Å erfolgte durch iterative Zyklen aus einer Verfeinerung mit isotropen Temperaturfaktoren durch Refmac5 (Murshudov et al., 1997) und manuellen Korrekturen auf Basis von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten. Die Verfeinerung wurde durch die Berechnung des modellunabhängigen Qualitätsindex  $R_{\text{free}}$  (Brünger, 1992; Brünger, 1993) kontrolliert, für den 5 % der Reflexe von der Verfeinerung ausgenommen wurden. Der Ligand Ectoin wurde nach Erzeugung der notwendigen Koordinaten mit Hilfe des PRODGR Server (Schüttelkopf und van Aalten, 2004), in die deutlich sichtbare Elektronendichte in  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten eingepasst und in das Modell integriert. Die Inspektion der  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten zeigte weiterhin eine Elektronendichte für vier Schweratome auf der Oberfläche des Proteins, die selbst in einer Elektronendichte-Karte bei  $8\sigma$  noch sichtbar waren und die an der Bildung von Kristallkontakten zwischen EhuB Molekülen in unterschiedlichen asymmetrischen Einheiten beteiligt sind (siehe Kapitel 3.2.6). Einen Anhaltspunkt auf die Art der Schweratome lieferte die Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen von EhuB. Diese ergab, dass keine Kristallbildung mehr erfolgte, wenn das Cadmiumsalz in der Kristallisationslösung durch ein Salz anderer zweiwertiger Ionen (z.B.  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$ ) ersetzt wurde, was auf eine zentrale Rolle der Cadmium-Ionen bei der Bildung der Kristalle hindeutet. Aus diesem Grund wurden in die Elektronendichten der an der Bildung der Kristallkontakte beteiligten Schweratome Cadmium-Ionen modelliert, was vor dem Hintergrund der fehlenden funktionalen Bedeutung der Cadmium-Ionen nicht mittels SAD verifiziert wurde. Die atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des so erhaltenen Modells wurden durch weitere iterative Zyklen aus einer Verfeinerung mit Refmac5 und manuellen Korrekturen des Modells in O auf Basis von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten verfeinert. Die Verfeinerung erfolgte in den ersten Runden mit isotropen Temperaturfaktoren, während im abschließenden Zyklus zusätzlich eine TLS-Verfeinerung (Winn et al., 2001) durchgeführt wurde. Für letztere wurde das Protein entsprechend seiner beiden Domänen in zwei TLS-Gruppen aufgeteilt, die die Reste 8 bis 98 und 199 bis 256 bzw. 99 bis 198 enthielten.

Eine weitere Verbesserung des Modells konnte durch die Verwendung des nativen Datensatzes von EhuB im Komplex mit Ectoin erreicht werden, wobei die Auflösung dieses Datensatzes auf Grund der hohen  $R_{\text{sym}}$  Werte in den letzten Auflösungsschalen auf 1,9 Å beschränkt wurde. Zu diesem Zweck erfolgte nach der Entfernung des Liganden Ectoin sowie der Cadmium-Ionen eine „Rigid body“ Verfeinerung des Modells gegen den nativen

Datensatz von EhuB mit gebundenem Ectoin. Die nach der weiteren Verfeinerung des Modells mit isotropen Temperaturfaktoren erhaltenen  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten erlaubten das manuelle Einpassen der am N-Terminus des Proteins fehlenden Reste in die deutlich sichtbare Elektronendichte unter Verwendung von O. Das auf diese Weise ermittelte Modell enthielt mit den Resten 1 bis 256 alle Aminosäurereste von EhuB. Das Modell wurde durch iterative Zyklen aus einer Verfeinerung mit isotropen Temperaturfaktoren mittels Refmac5 und manuellen Korrekturen des Modells in O auf Basis von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten verfeinert. Im Anschluss an die Verfeinerung wurden der gebundene Ligand Ectoin sowie die vier Cadmium-Ionen mit Hilfe von O in die deutlich sichtbare Elektronendichte in  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten eingepasst und in das Modell eingefügt. Das resultierende Modell wurde wie bereits beschrieben mit isotropen Temperaturfaktoren verfeinert. Die in den Elektronendichte-Karten sichtbaren Wassermoleküle wurden automatisch mit Hilfe von ARP/wARP (Lamzin und Wilson, 1993) bei einem Schwellenwert von  $2,5\sigma$  identifiziert. Die ermittelten Wassermoleküle wurden visuell mit O in  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten überprüft und Wassermoleküle mit eindeutiger Elektronendichte in das Modell eingefügt, wobei 151 Wassermoleküle identifiziert wurden. Die atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des Modells wurden durch iterative Zyklen aus einer Verfeinerung mit Refmac5 und manuellen Korrekturen des Modells in O auf Basis von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten verfeinert. Die Verfeinerung erfolgte in den ersten Runden mit isotropen Temperaturfaktoren, während in der letzten Runde zusätzlich eine TLS-Verfeinerung verwendet wurde. Für letztere wurde das Protein entsprechend seiner beiden Domänen in zwei TLS-Gruppen aufgeteilt, die die Reste 1 bis 98 und 199 bis 256 bzw. 99 bis 198 enthielten. Die Werte für die Qualitätsindikationen  $R_f$  und  $R_{free}$  fielen nach dieser abschließenden Verfeinerung mit Refmac5 auf 21,4 % und 25,0 % bei einer Auflösung von 1,9 Å und einem mittleren B-Faktor von 28,4 Å<sup>2</sup>. Das endgültige Modell von EhuB im Komplex mit Ectoin enthält pro asymmetrischer Einheit einen Monomer mit den 256 Aminosäureresten des nativen Proteins, ein Molekül Ectoin, 4 Cadmium Ionen und 151 Wasser Moleküle. Weiterhin enthält das Modell der Polypeptidkette zwei Disulfidbrücken die von den Resten Cys<sup>86</sup> und Cys<sup>253</sup> sowie Cys<sup>97</sup> und Cys<sup>201</sup> gebildet werden, sowie zwei cis-Peptidbindungen zwischen den Resten Pro<sup>22</sup> und Pro<sup>23</sup> sowie Ala<sup>192</sup> und Pro<sup>193</sup>.

Die Analyse der stereochemischen Qualität des Modells durch PROCHECK (Laskowski et al., 1993) ergab, dass von den 214 nicht-Glycin und nicht-Prolin Resten von EhuB 199 Reste oder 93,0 % in der „most favoured“ Region und 15 Reste oder 7,0 % in der „additional allowed“ Region des Ramachandran Diagramms liegen.

Die Statistiken der Verfeinerung des Modells von EhuB im Komplex mit Ectoin sind in *Tab. 3.13* dargestellt.

| Ligand                               | Ectoin                   | Hydroxyectoin            |
|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Auflösung (Å)                        | 20 – 1,9 (1,949 – 1,900) | 20 – 2,5 (2,635 – 2,500) |
| Zahl der Reflexe                     | 20521                    | 9011                     |
| Davon im Test Satz                   | 5,2 %                    | 4,7 %                    |
| $R_f$ (%) <sup>a,b</sup>             | 21,4 (23,0)              | 21,9 (26,8)              |
| $R_{free}$ (%) <sup>a,c</sup>        | 25,0 (32,5)              | 26,8 (29,1)              |
| Mittlerer B-Faktor (Å <sup>2</sup> ) | 28,4                     | 37,7                     |
| rmsd-Bindungslängen (Å)              | 0,008                    | 0,007                    |
| rmsd-Bindungswinkel (°)              | 1,217                    | 1,054                    |
| Ramachandran plot                    |                          |                          |
| most favoured                        | 199 (93,0 %)             | 199 (93,0 %)             |
| additional allowed                   | 15 (7,0 %)               | 15 (7,0 %)               |
| Protein                              | 256 Reste                | 256 Reste                |
| Ligand                               | 1 Molekül Ectoin         | 1 Molekül Hydroxyectoin  |
| Ionen                                | 4 Cd <sup>2+</sup>       | 4 Cd <sup>2+</sup>       |
| Wasser Moleküle                      | 151                      | 96                       |

*Tab. 3.13:* Verfeinerungsstatistiken und Analyse der Qualität der EhuB Modelle. Die Verfeinerungsstatistiken wurden unter Verwendung von Refmac5 erstellt. Die Ramachandran Analyse erfolgte durch PROCHECK (Laskowski et al., 1993).

<sup>a</sup> Die Zahlen in Klammern geben die Werte für die letzte Auflösungsschale (siehe Auflösung) an.

$$^b R_f = \frac{\sum_{hkl} \|F_{obs}\| - \|F_{calc}\|}{\sum_{hkl} \|F_{obs}\|}$$

<sup>c</sup>  $R_{free}$  wird analog zu  $R_f$  bestimmt, jedoch werden die zu seiner Berechnung verwendeten Reflexe des Test Satzes von der Verfeinerung ausgenommen.

### 3.2.5 Strukturbestimmung von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin

Die Bestimmung der Phasenwinkel der Strukturfaktoren für den von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin erhaltenen Datensatz erfolgte mittels MR unter Verwendung der Struktur von EhuB mit gebundenem Ectoin als Suchmodell. Zu diesem Zweck wurden der Ligand Ectoin, die gebundenen Cadmium-Ionen und die Wassermoleküle aus dem Modell entfernt. Das auf diese Weise modifizierte Modell wurde im Rahmen des MR mit dem Programm AMoRe aus der CCP4 Suite in einem Auflösungsbereich von 4 Å bis 10 Å und mit einem Radius der Rotationsfunktion von 25 Å als Suchmodell verwendet.

| Lösung | R-Faktor | Korrelationskoeffizient |
|--------|----------|-------------------------|
| 1      | 36,9 %   | 65,5                    |
| 2      | 55,8 %   | 16,6                    |

*Tab. 3.14:* R-Faktoren und Korrelationskoeffizienten der beiden ersten Lösungen des MR für den Datensatz von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin.

Hierbei konnte, wie die in *Tab. 3.14* dargestellten R-Faktoren und Korrelationskoeffizienten der beiden ersten Lösungen des MR zeigen, eine eindeutige Lösung gefunden werden. Die

atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des ermittelten Modells wurden unter Verwendung des auf eine Auflösung von 2,5 Å beschränkten Datensatzes von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin durch iterative Zyklen aus einer Verfeinerung mit isotropen Temperaturfaktoren mittels Refmac5 und manuellen Korrekturen des Modells in O auf Basis von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten verfeinert. Im Anschluss an die Verfeinerung wurden der gebundene Ligand Hydroxyectoin sowie die vier Cadmium-Ionen mit Hilfe von O in die deutlich sichtbare Elektronendichte in  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten eingepasst, in das Modell eingefügt und dieses wie soeben beschrieben verfeinert. Die in den Elektronendichte-Karten sichtbaren Wassermoleküle wurden automatisch mit Hilfe von ARP/wARP bei einem Schwellenwert von  $3,2\sigma$  identifiziert. Die gefundenen Wassermoleküle wurden visuell mit O in  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten überprüft und Wassermoleküle mit eindeutiger Elektronendichte in das Modell eingefügt, wobei 96 Wassermoleküle ermittelt wurden. Die atomaren Positionen und Temperaturfaktoren des Modells wurden durch iterative Zyklen aus einer Verfeinerung mit Refmac5 und manuellen Korrekturen des Modells in O auf Basis von  $2F_o-F_c$  und  $1F_o-F_c$  Elektronendichte-Karten verfeinert. Die Verfeinerung erfolgte in den ersten Runden mit isotropen Temperaturfaktoren, während in der letzten Runde zusätzlich eine TLS-Verfeinerung verwendet wurde. Für letztere wurde das Protein entsprechend seiner beiden Domänen in zwei TLS-Gruppen aufgeteilt, die die Reste 1 bis 97 und 201 bis 256 bzw. 98 bis 200 enthielten.

Im Zuge der Verfeinerung ergaben sich für die Struktur von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin  $R_f$  und  $R_{free}$  Werte von 21,9 % und 26,8 % bei einer Auflösung von 2,5 Å und einem mittleren B-Faktor von  $37,7 \text{ \AA}^2$ . Das endgültige Modell von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin besteht aus den 256 Aminosäureresten des nativen Proteins, einem Molekül Hydroxyectoin, 4 Cadmium Ionen und 96 Wasser Molekülen. Im Modell der Polypeptidkette finden sich weiterhin die für die Struktur mit Ectoin beschriebenen Disulfidbrücken und cis-Peptidbindungen. Die Analyse der stereochemischen Qualität des Modells durch PROCHECK zeigte, dass von den 214 nicht-Glycin und nicht-Prolin Resten von EhuB 199 Reste oder 93,0 % in der „most favoured“ Region und 15 Reste oder 7,0 % in der „additional allowed“ Region des Ramachandran Diagramms liegen. In *Tab. 3.13* sind die Statistiken der Verfeinerung von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin zusammengefasst.

### 3.2.6 Die Struktur von EhuB im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin

Die Struktur von EhuB im Komplex mit einem seiner Substrate Ectoin oder Hydroxyectoin besitzt eine ellipsoide Form und hat Dimensionen von  $60 \text{ \AA} \times 35 \text{ \AA} \times 35 \text{ \AA}$ . Die beschriebenen Strukturmodelle enthalten in beiden Fällen alle 256 Reste des nativen Proteins. Die im zur Kristallisation verwendeten rekombinanten EhuB zusätzlich am N-Terminus des Proteins vorhandenen 14 Reste eines „Strep-Tag“ sowie einer Faktor Xa Schnittstelle sind auf Grund fehlender Elektronendichte nicht im Modell enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit wird zur Bezeichnung der Reste von EhuB die Zählweise des nativen Proteins verwendet. Das Strukturmodell enthält neben dem beschriebenen Monomer von EhuB ein Molekül des entsprechenden Substrats und vier nicht-kovalent gebundene Cadmium-Ionen. Die Struktur zeigt EhuB in

seiner Substrat gebundenen geschlossenen Konformation, welche in zwei globuläre Domänen unterteilt werden kann, die durch eine Gelenkregion miteinander verbunden sind. Die erste Domäne wird dabei von den Aminosäureresten 1 bis 95 und 203 bis 256 gebildet, während die Zweite aus den Resten 100 bis 197 besteht. Diese beiden globulären Domänen werden von einer aus den Resten 96 bis 99 und 198 bis 202 bestehenden Gelenkregion verbunden. Innerhalb der beiden Domänen bildet die Polypeptidkette 12  $\alpha$ -Helices und 14  $\beta$ -Faltblätter als Sekundärstrukturelemente aus.

Der Vergleich der beiden globulären Domänen des Proteins zeigt eine ähnliche Topologie, bei welcher ein zentrales fünfsträngiges  $\beta$ -Faltblatt von  $\alpha$ -Helices flankiert wird. In EhuB sind die beiden Domänen, durch eine aus zwei Segmenten der Polypeptidkette bestehende Gelenkregion, in einer Weise verbunden, dass ihre zentralen  $\beta$ -Faltblätter einander zugewandt sind. Diese grundlegende Faltung findet sich in ähnlicher Form in den meisten Bindeproteinen wieder und wird aus diesem Grund als Bindeproteinfaltung bezeichnet (Wilkinson und Verschueren, 2003).

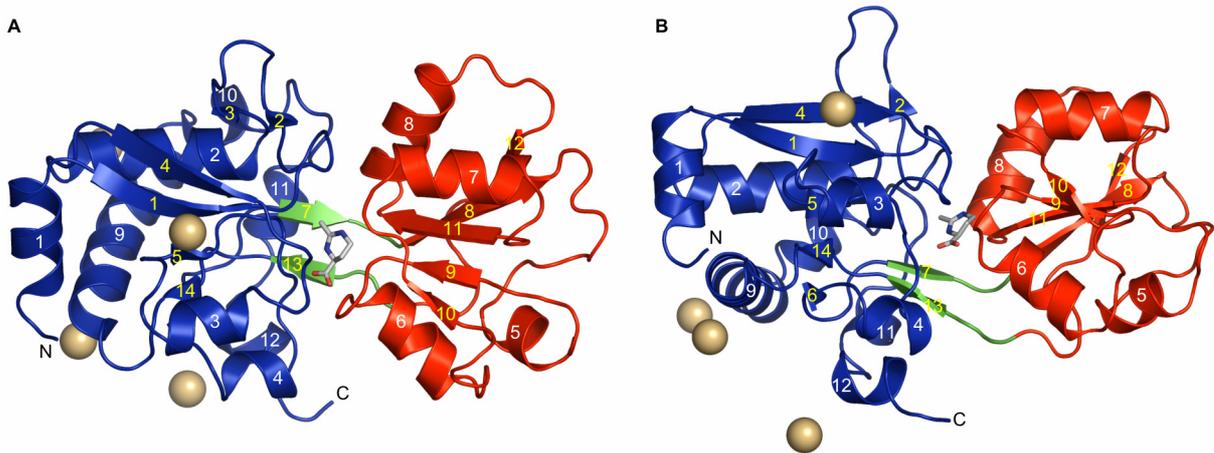


Abb. 3.15: Die Struktur von EhuB. In (A) ist der Komplex von EhuB mit Ectoin gezeigt. Die Domäne 1 (Reste 1 - 95 und 203 - 256) und die Domäne 2 (Reste 100 - 197) sind in den Farben blau und rot dargestellt. Die aus den Resten 96 bis 99 und 198 bis 202 bestehende Gelenkregion ist grün eingefärbt. Die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter sind in weiß und gelb nummeriert. Der Ligand Ectoin ist in Form eines "stick" Modells und die vier Cadmium-Ionen in Form von Kugeln gezeigt. In (B) ist der EhuB Monomer aus (A) um 90° entlang seiner Längsachse gedreht.

Die Substratbindeproteine werden auf Grund ihrer Faltung in drei Untergruppen eingeteilt, die sich in der Zahl der verbindenden Segmente zwischen den beiden Domänen unterscheiden. Die Substratbindeproteine der Gruppe I besitzen eine Gelenkregion, die aus drei Segmenten der Polypeptidkette besteht. Im Unterschied dazu verfügen die Vertreter der Gruppe II lediglich über zwei verbindende Segmente. Eine eigene Gruppe bilden Substratbindeproteine wie BtuF aus *E. coli* (Borths et al., 2002; Karpowich et al., 2003), PsaA aus *S. pneumoniae* (Lawrence et al., 1998) und FhuD aus *E. coli* (Clarke et al., 2000), die nur ein verbindendes Segment besitzen. Das Substratbindeprotein EhuB besitzt entsprechend dieser Einteilung, wie Abb. 3.15 zeigt, eine Gruppe II Faltung.

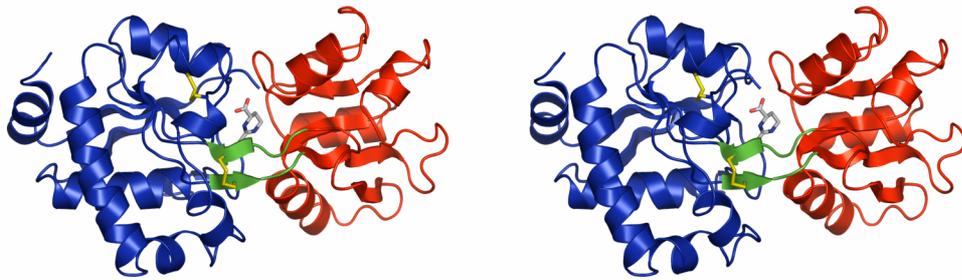


Abb. 3.16: Stereoabbildung der Disulfidbrücken in der Struktur von EhuB. Die Struktur von EhuB weist zwei intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Resten Cys<sup>97</sup> und Cys<sup>201</sup> sowie Cys<sup>86</sup> und Cys<sup>253</sup> auf. Die Reste, die die Disulfidbrücken bilden, sind gelb eingefärbt, ansonsten ist die Farbgebung analog zu Abb. 3.15. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Struktur von EhuB im Komplex mit Ectoin.

Die dreidimensionale Struktur von EhuB wird, wie Abb. 3.16 zeigt, durch zwei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Die erste dieser Disulfidbrücken liegt in der Gelenkregion zwischen den beiden globulären Domänen des Proteins und wird von den Resten Cys<sup>97</sup> und Cys<sup>201</sup> gebildet, wobei sie die  $\beta$ -Faltblätter 7 und 13 verbindet. Die zweite Disulfidbrücke zwischen den Resten Cys<sup>86</sup> und Cys<sup>253</sup> verbindet den C-Terminus des Proteins mit Helix 4, die einen Teil der Bindungstasche für die Substrate formt, und fixiert den C-Terminus des Proteins auf diese Weise.

Die Kristallkontakte zwischen den EhuB Monomeren in den unterschiedlichen asymmetrischen Einheiten werden – wie bereits angedeutet – unter anderem von vier in den Elektronendichte-Karten deutlich sichtbaren Schweratomen gebildet. Bei diesen handelt es sich auf Grund der Abhängigkeit der Kristallbildung von Cadmium-Ionen wahrscheinlich um letztere. Die Koordinierung der Cadmium-Ionen erfolgt in der Regel durch jeweils zwei Carboxylat-Gruppen von Aspartat- und Glutamat-Resten, die von EhuB Monomeren aus unterschiedlichen asymmetrischen Einheiten stammen. Eine Ausnahme hiervon bildet das in Abb. 3.17D gezeigte Cadmium-Ion 4, das unter anderem von der Hydroxyl-Gruppe eines Serin-Restes und dem Imidazol-Ring eines Histidin-Restes koordiniert wird. Die Cadmium-Ionen sind weiterhin mit zwei bis drei Wassermolekülen assoziiert, wobei Cadmium-Ion 4 mit lediglich zwei Wassermolekülen auch in diesem Kontext eine Sonderstellung einnimmt. Im Einzelnen wird das Cadmium-Ion 1, wie Abb. 3.17A zeigt, von den Carboxylat-Gruppen von Glu<sup>250</sup> eines Monomers und Asp<sup>146</sup> eines Symmetrie-verwandten Monomers koordiniert, wobei die Elektronendichte der Seitenkette von Glu<sup>250</sup> lediglich teilweise definiert ist. Im Fall des in Abb. 3.17B dargestellten Cadmium-Ions 2 erfolgt die Koordinierung durch die Seitenketten von Glu<sup>226</sup> eines Monomers und Asp<sup>117</sup> eines benachbarten Monomers. Die Elektronendichte der Seitenkette von Glu<sup>226</sup> ist jedoch auch in diesem Fall nur teilweise definiert. Das Cadmium-Ion 3 wird, wie in Abb. 3.17C gezeigt, von der Seitenkette von Asp<sup>215</sup> eines Monomers und Asp<sup>167</sup> eines Symmetrie-verwandten Monomers koordiniert. Im Unterschied dazu wird das in Abb. 3.17D dargestellte Cadmium-Ion 4 von den Seitenketten von Ser<sup>56</sup> und His<sup>72</sup> eines Monomers und Glu<sup>59</sup> eines benachbarten Monomers koordiniert.

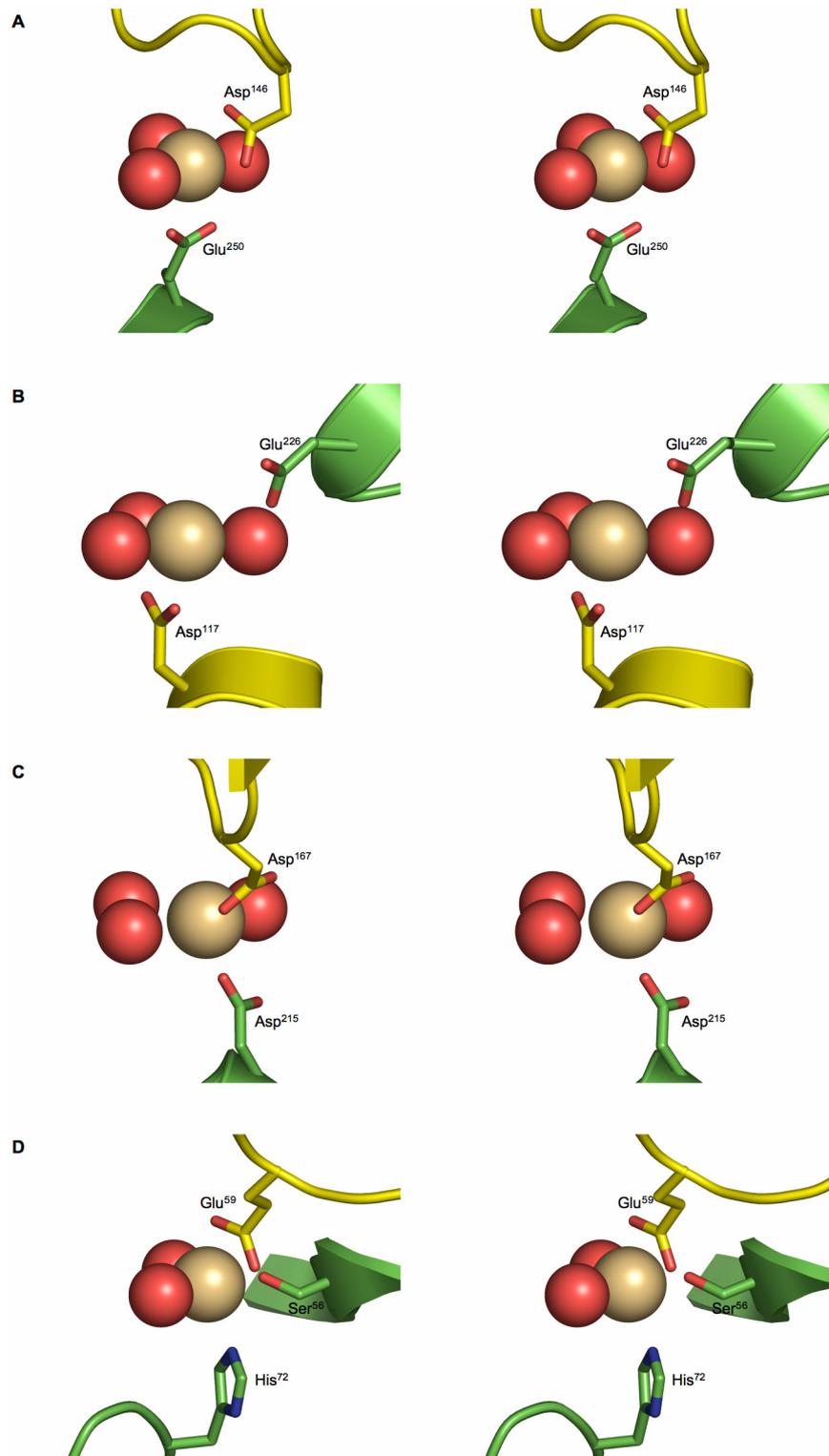


Abb. 3.17: Kristallkontakte in der Struktur von EhuB. Die Stereoabbildung zeigt die vier in der Struktur von EhuB identifizierte Cadmium-Ionen. Diese werden jeweils von Resten zweier EhuB Monomere aus unterschiedlichen asymmetrischen Einheiten koordiniert. Die in grün dargestellten Reste stammen aus dem gleichen EhuB Monomer, während die gelb eingefärbten Reste von unterschiedlichen Symmetrie-verwandten Monomeren bereitgestellt werden. Die Cadmium-Ionen (in hellbraun) und die Wassermoleküle (in rot) sind Form von „stick“ Modellen gezeigt (weitere Erläuterungen siehe Text).

Der Vergleich der in den beiden vorliegenden Strukturen gebundenen Cadmium-Ionen mit den in anderen Strukturen gebundenen Cadmium-Ionen zeigt, wie das Beispiel des Histidin Bindeprotein HisJ aus *E. coli* (Yao et al., 1994) belegt, eine ähnliche Funktion dieser Ionen bei der Bildung von Kristallkontakten. Denn in HisJ sind – vergleichbar zu EhuB – sechs der sieben gebundenen Cadmium-Ionen an Wechselwirkungen mit Proteinmolekülen aus

unterschiedlichen asymmetrischen Einheiten beteiligt und stabilisieren auf diese Weise das Kristallgitter. Die Koordinierung der Cadmium-Ionen erfolgt dabei, wie bei EhuB, im Wesentlichen über die Carboxylat-Gruppen von Aspartat- und Glutamat-Resten, wobei jedoch auch in HisJ eine Interaktion mit der Seitenkette eines Histidin-Restes gefunden wird.

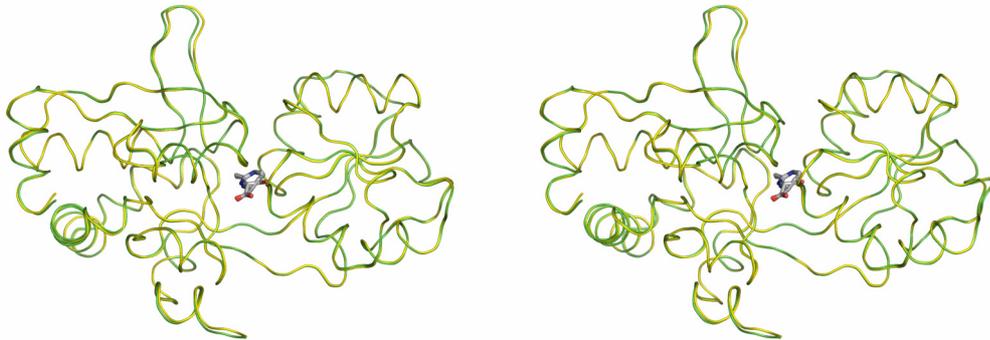


Abb. 3.18: Überlagerung des Peptidrückgrats von EhuB im Komplex mit seinen Substraten. Die Stereoabbildung zeigt das Peptidrückgrat von EhuB im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin in grün bzw. gelb. Die Substrate Ectoin oder Hydroxyectoin sind in Form von „stick“ Modellen gezeigt.

Die Überlagerung der dreidimensionalen Strukturen von EhuB im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin ergibt, wie Abb. 3.18 zeigt, keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der  $C_{\alpha}$ -Atome. Dieses spiegelt sich auch in dem im Rahmen der Überlagerung der Strukturen unter Verwendung von LSQMAN (Kleywegt, 1999) erhaltenen rmsd-Wert von 0,204 Å für alle 256  $C_{\alpha}$ -Atome wider. Die Überlagerung der beiden Strukturen erfolgte mit einem „global superposition-distance-based Needleman-Wunsch“ Algorithmus unter Verwendung eines Distanzschwellenwertes von 3,5 Å.

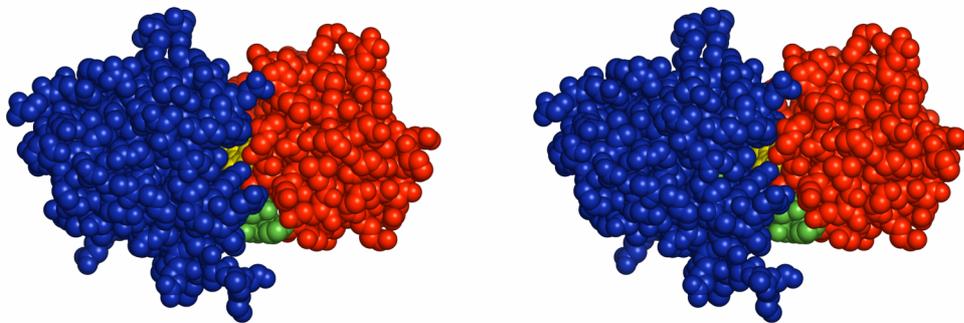


Abb. 3.19: Raumfüllendes Modell von EhuB im Komplex mit Ectoin. Die Domänen 1 und 2 sowie die sie verbindende Gelenkregion sind in der Stereoabbildung blau, rot und grün eingefärbt. Das gebundene Substrat Ectoin ist in Form eines raumfüllenden Modells in gelb dargestellt.

Die Substratbindungsstelle von EhuB ist in beiden vorliegenden Strukturen, wie auf Grundlage anderer Bindeproteinstrukturen erwartet, in der Spalte zwischen den Domänen lokalisiert. Das an der Grenzfläche der beiden Domänen gebundene Substrat wird, wie Abb. 3.19 verdeutlicht, von diesen eingeschlossen und steht lediglich durch einen Tunnel zwischen den „Loops“, die  $\beta$ -Faltblatt 9 und  $\alpha$ -Helix 6 sowie  $\beta$ -Faltblatt 5 und  $\alpha$ -Helix 4 verbinden, mit dem umgebenden Lösungsmittel in Kontakt. Die Analyse der Substratbindungsstelle, die im nächsten Abschnitt ausführlich betrachtet wird, zeigt, dass in der Struktur von EhuB im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin sieben bzw. acht Reste an der Wechselwirkung mit dem entsprechenden Substrat beteiligt sind.

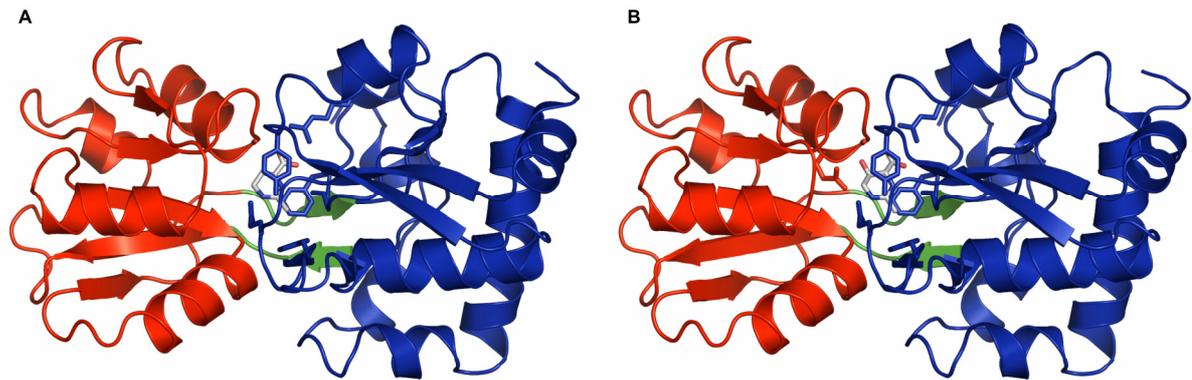


Abb. 3.20: Domänenzugehörigkeit der an der Bindung des Substrats beteiligten Reste von EhuB im Komplex mit (A) Ectoin und (B) Hydroxyectoin. Die Domänen 1 und 2 sowie die Gelenkregion des Proteins sind jeweils blau, rot oder grün eingefärbt. Die Substrate und die an ihrer Bindung beteiligten Reste werden als „stick“ Modelle dargestellt.

Diese mit den Substraten interagierenden Reste sind, wie Abb. 3.20 verdeutlicht, ungleich auf die beiden Domänen des Proteins verteilt. In der Struktur von EhuB im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin stammen sechs von sieben bzw. sechs von acht der mit dem entsprechenden Substrat wechselwirkenden Reste aus der Domäne 1. Der Vergleich mit anderen Substratbindeproteinen verdeutlicht die Sonderstellung von EhuB in dieser Beziehung. Im Unterschied zu EhuB sind in den ähnliche Liganden bindenden Substratbindeproteinen OpuAC aus *B. subtilis* (Horn et al., 2006) sowie ProX aus *A. fulgidus* (Schiefner et al., 2004b) und ProX aus *E. coli* (Schiefner et al., 2004a) drei von sechs, fünf von acht und vier von sechs mit dem Substrat Glycin-Betain wechselwirkende Reste in einer Domäne lokalisiert. Eine vergleichbare Verteilung der an der Substratbindung beteiligten Reste findet sich auch bei anderen Vertretern dieser Proteinklasse. Dieses zeigt beispielsweise das Histidin Bindeprotein HisJ aus *E. coli* (Yao et al., 1994), bei dem sieben von zwölf mit dem Substrat Histidin wechselwirkende Reste aus einer Domäne stammen.

### 3.2.7 Die Substratbindungsstelle von EhuB

Die Analyse der an der Bindung von Ectoin beteiligten Reste von EhuB zeigt, dass diese das Substrat mittels unterschiedlicher Arten von Wechselwirkungen binden. Die Interaktion mit der negativ geladenen Carboxylat-Gruppe des Substrats erfolgt durch die Bildung von Salzbrücken mit der Seitenkette von Arg<sup>85</sup> sowie mittels Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hauptketten Stickstoffatomen von Phe<sup>80</sup> und Thr<sup>133</sup>. Die Reste Arg<sup>85</sup> und Phe<sup>80</sup> stammen dabei aus der Domäne 1 wohingegen der Rest Thr<sup>133</sup> der Domäne 2 zuzuordnen ist. Die beschriebenen Salzbrücken zwischen den Stickstoffatomen der Guanidino-Gruppe von Arg<sup>85</sup> und der Carboxylat-Gruppe von Ectoin besitzen dabei eine Länge von 2,77 Å, 2,86 Å, 3,32 Å und 3,79 Å, wobei das Kriterium für das Vorliegen einer Salzbrücke ein Abstand von weniger als 4 Å eines negativ geladenen Carboxylat-Sauerstoffatoms und eines positiv geladenen Stickstoffatoms ist (Barlow und Thornton, 1983; Kumar und Nussinov, 1999). Weiterhin haben die Wasserstoffbrückenbindungen von Phe<sup>80</sup> und Thr<sup>133</sup> mit der Carboxylat-Gruppe des Substrats eine Länge von 2,91 Å und 2,79 Å, wobei das Kriterium für ihr Vorliegen ein Was-

serstoffbrücken-Donor und ein Akzeptor in einem Abstand von 2,5 Å bis 3,2 Å voneinander ist (Jeffrey, 1997).

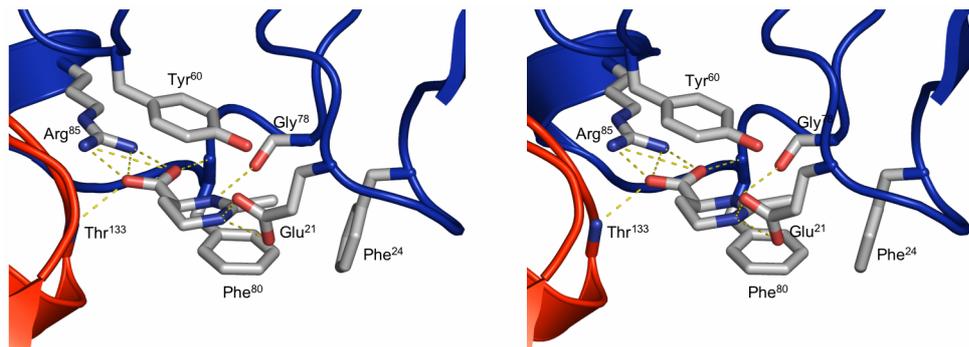


Abb. 3.21: Stereoabbildung der Substratbindungsstelle von EhuB mit gebundenem Ectoin. Die Abbildung zeigt die für die Bindung des Substrats Ectoin relevanten Teile der Polypeptidkette, wobei die Domänen 1 und 2 in blau und rot wiedergegeben sind. Die Darstellung des Substrats und der mit ihm interagierenden Reste erfolgt als „stick“ Modell. Die Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte gelbe Linien angedeutet.

Im Unterschied zur negativ geladenen Carboxylat-Gruppe wird die Bindungstasche des kationischen Anteils von Ectoin, wie Abb. 3.21 zeigt, zu großen Teilen von den aromatischen Systemen der Reste Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> gebildet, die das gebundene Substrat von drei Seiten einschließen. Die Ebenen der aromatischen Systeme der Reste Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> liegen dabei in etwa parallel zur Ringebene von Ectoin oberhalb und unterhalb des Substrats, wobei das aromatische System von Phe<sup>80</sup> relativ zum Ringsystem von Ectoin verschoben ist. Im Gegensatz zu den beiden anderen aromatischen Resten bildet die Ebene des aromatischen Systems von Phe<sup>24</sup>, das sich vor der Methyl-Gruppe des Substrats befindet, näherungsweise einen rechten Winkel mit der Ringebene von Ectoin. Zur Beschreibung der Wechselwirkungen der aromatischen Reste von Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> mit dem Substrat Ectoin wurden die Distanzen der Atome dieser Reste zu den Atomen des Substrats bestimmt, um durch einen Vergleich mit veröffentlichten van der Waals Radien (Li und Nussinov, 1998) die Zahl der Kontakte zu bestimmen. Für die Atome N<sup>1</sup>, C<sup>2</sup>, N<sup>3</sup>, C<sup>4</sup>, C<sup>5</sup>, O<sup>5</sup>, C<sup>6</sup>, C<sup>7</sup>, O<sup>7</sup> und C<sup>8</sup> der Substrate Ectoin bzw. Hydroxyectoin wurden van der Waals Radien von 1,65 Å, 1,74 Å, 1,65 Å, 2,01 Å, 1,92 Å, 1,54 Å, 1,92 Å, 1,76 Å, 1,49 Å, 1,92 Å angenommen. Für die C<sub>γ</sub> Atome der Phenylalanin-Reste sowie die C<sub>γ</sub> und C<sub>z</sub> Atome der Tyrosin-Reste bzw. das O<sub>η</sub> Atom der Tyrosin-Reste wurden van der Waals Radien von 1,74 Å bzw. 1,54 Å verwendet, während für die verbleibenden Atome der aromatischen Systeme der Phenylalanin- und Tyrosin-Reste ein van der Waals Radius von 1,82 Å angenommen wurde. Die Atome der Substrate und der aromatischen Reste waren somit bei einer Standardabweichung von ~ 0,5 Å (Li und Nussinov, 1998) miteinander im Kontakt, wenn ihr Abstand innerhalb der in Tab. 3.15 gezeigten Grenzen lag.

| Atom im Substrat                                 | Phe: C <sub>δ</sub> , C <sub>ε</sub> , C <sub>ζ</sub> ; Tyr: C <sub>δ</sub> , C <sub>ε</sub> | Phe: C <sub>γ</sub> ; Tyr: C <sub>γ</sub> , C <sub>ζ</sub> | Tyr: O <sub>η</sub> |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------|
| N <sup>1</sup> & N <sup>3</sup>                  | 3,22 – 3,72 Å                                                                                | 3,14 – 3,64 Å                                              | 2,94 – 3,44 Å       |
| C <sup>2</sup>                                   | 3,31 – 3,81 Å                                                                                | 3,23 – 3,73 Å                                              | 3,03 – 3,53 Å       |
| C <sup>4</sup>                                   | 3,58 – 4,08 Å                                                                                | 3,50 – 4,00 Å                                              | 3,30 – 3,80 Å       |
| C <sup>5</sup> , C <sup>6</sup> & C <sup>8</sup> | 3,49 – 3,99 Å                                                                                | 3,41 – 3,91 Å                                              | 3,21 – 3,71 Å       |
| O <sup>5</sup>                                   | 3,11 – 3,61 Å                                                                                | 3,03 – 3,53 Å                                              | 2,83 – 3,33 Å       |
| C <sup>7</sup>                                   | 3,33 – 3,83 Å                                                                                | 3,25 – 3,75 Å                                              | 3,05 – 3,55 Å       |
| O <sup>7</sup>                                   | 3,06 – 3,56 Å                                                                                | 2,98 – 3,48 Å                                              | 2,78 – 3,28 Å       |

Tab. 3.15: van der Waals Kontakt Distanzen nach (Li und Nussinov, 1998). Gezeigt sind die Distanzen innerhalb derer die Atome von Ectoin bzw. Hydroxyectoin mit den Atomen der aromatischen Systeme von Phenylalanin- und Tyrosin-Resten von EhuB in Kontakt sind.

Für die aromatischen Systeme der Reste von Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> ergaben sich auf diese Weise sechs, sieben und fünf van der Waals Kontakte mit dem Substrat Ectoin, die in Abb. 3.22 dargestellt sind. Die aromatischen Systeme der Reste Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> bilden dabei im Gegensatz zu Phe<sup>24</sup> jeweils zwei van der Waals Kontakte mit den partiell positiv geladenen Stickstoffatomen des Substrats Ectoin aus.

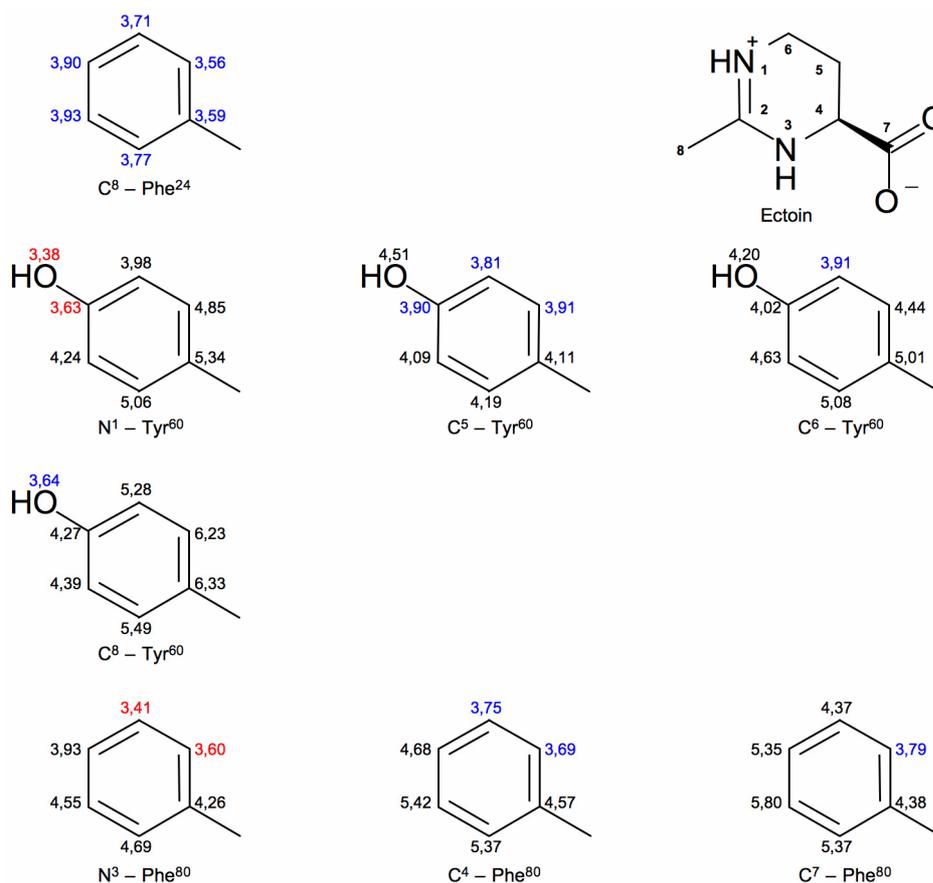


Abb. 3.22: van der Waals Kontakte zwischen dem Substrat Ectoin und den aromatischen Systemen der Reste Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> des Substratbindeproteins EhuB. Gezeigt sind die Distanzen zwischen den angegebenen Atomen des Substrats und den einzelnen Atomen der mit dem Substrat in Kontakt stehenden aromatischen Systeme der Reste Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup>. Die Distanzen der mit den Stickstoffatomen N<sup>1</sup> oder N<sup>3</sup> bzw. den sonstigen Atomen des Substrats in Kontakt stehenden Atome des Proteins sind rot bzw. blau eingefärbt. Die verwendeten van der Waals Radien der entsprechenden Atome beruhen auf Literaturangaben (Li und Nussinov, 1998).

Neben den beschriebenen Wechselwirkungen mit den aromatischen Resten Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> wird der kationische Anteil von Ectoin durch zwei Salzbrücken mit der Seitenkette von

Glu<sup>21</sup> sowie eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hauptketten Carbonyl-Funktion von Gly<sup>78</sup> gebunden, wobei alle genannten Reste aus der Domäne 1 stammen. Die Salzbrücken zwischen der Seitenkette von Glu<sup>21</sup> und dem N<sup>1</sup> Atom von Ectoin haben eine Länge von 2,87 Å und 3,04 Å, während die Wasserstoffbrückenbindung der Carbonyl-Funktion von Gly<sup>78</sup> mit dem N<sup>3</sup> Atom des Substrats eine Länge von 2,90 Å besitzt.

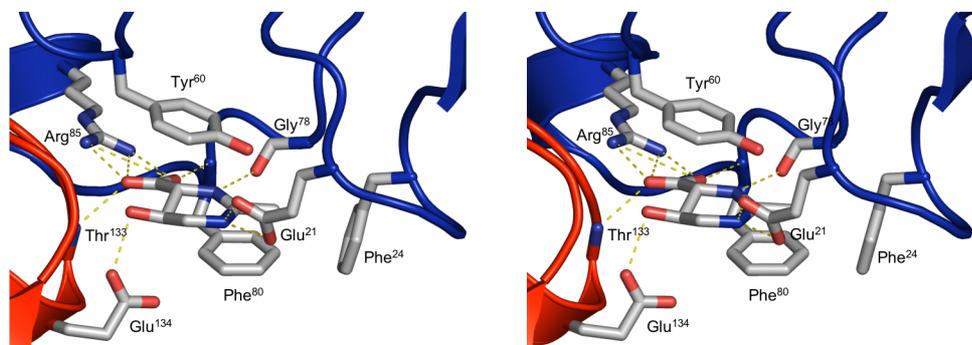


Abb. 3.23: Stereoabbildung der Substratbindungsstelle von EhuB mit gebundenem Hydroxyectoin. Die Abbildung zeigt die für die Bindung des Substrats Hydroxyectoin relevanten Teile der Polypeptidkette, wobei die Domänen 1 und 2 in blau und rot wiedergegeben sind. Die Darstellung des Substrats und die mit ihm interagierenden Reste erfolgt als „stick“ Modell. Die Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte gelbe Linien angedeutet.

Die in Abb. 3.23 gezeigte Substratbindungsstelle von EhuB im Komplex mit Hydroxyectoin zeigt ein der Struktur mit gebundenem Ectoin ähnliches Bild. Die Wechselwirkung des Proteins mit der negativ geladenen Carboxylat-Gruppe des Substrats erfolgt ebenfalls durch die Bildung von Salzbrücken mit der Seitenkette von Arg<sup>85</sup> sowie mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hauptketten Stickstoffatomen von Phe<sup>80</sup> und Thr<sup>133</sup>. Die an der Bildung der Salzbrücken beteiligten Stickstoffatome der Seitenkette von Arg<sup>85</sup> und die Carboxylat-Gruppe des Hydroxyectoins besitzen eine Distanz von 2,76 Å, 2,86 Å, 3,29 Å und 3,85 Å. Weiterhin haben die Wasserstoffbrückenbindungen der Reste Phe<sup>80</sup> und Thr<sup>133</sup> mit dem Substrat eine Länge von 2,96 Å und 2,78 Å. Im Unterschied zur in Abb. 3.21 beschriebenen Substratbindungsstelle von EhuB im Komplex mit Ectoin zeigt die Struktur mit gebundenem Hydroxyectoin eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Sauerstoffatom O<sub>e1</sub> der Seitenkette von Glu<sup>134</sup> und der lediglich in diesem Substrat vorhandenen Hydroxyl-Gruppe, wobei diese eine Länge von 2,78 Å besitzt. Die Wechselwirkung von EhuB mit dem kationischen Anteil von Hydroxyectoin erfolgt – wie schon im Fall von Ectoin – mit Hilfe der aromatischen Systeme der Reste Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup>. Diese schließen das Substrat von drei Seiten ein, wobei die Ebenen der aromatischen Systeme der Reste Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> näherungsweise parallel zur Ringebene von Hydroxyectoin liegen, während die Ebene des aromatischen Systems von Phe<sup>24</sup> in etwa einen rechten Winkel mit dieser bildet. Die aromatischen Systeme der Reste Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> bilden nach den in Tab. 3.15 beschriebenen Kriterien, wie Abb. 3.24 zeigt, mit dem Substrat Hydroxyectoin sechs, elf und zwei van der Waals Kontakte aus. Das aromatische System des Restes Tyr<sup>60</sup> steht dabei in drei Fällen in direktem Kontakt mit den partiell positiv geladenen Stickstoffatomen des Substrats Hydroxyectoin. Weiterhin interagiert das Protein mit dem N<sup>1</sup> des Substrats durch die Bildung von zwei Salzbrücken mit der Seitenkette von Glu<sup>21</sup> sowie durch eine Wasserstoffbrückenbindung der Hauptketten Carbonyl-Funktion von Gly<sup>78</sup> mit dem N<sup>3</sup> von

Hydroxyectoin. Die beiden Salzbrücken besitzen dabei eine Länge von 2,77 Å und 3,10 Å, während die Wasserstoffbrückenbindung eine Länge von 2,98 Å hat.

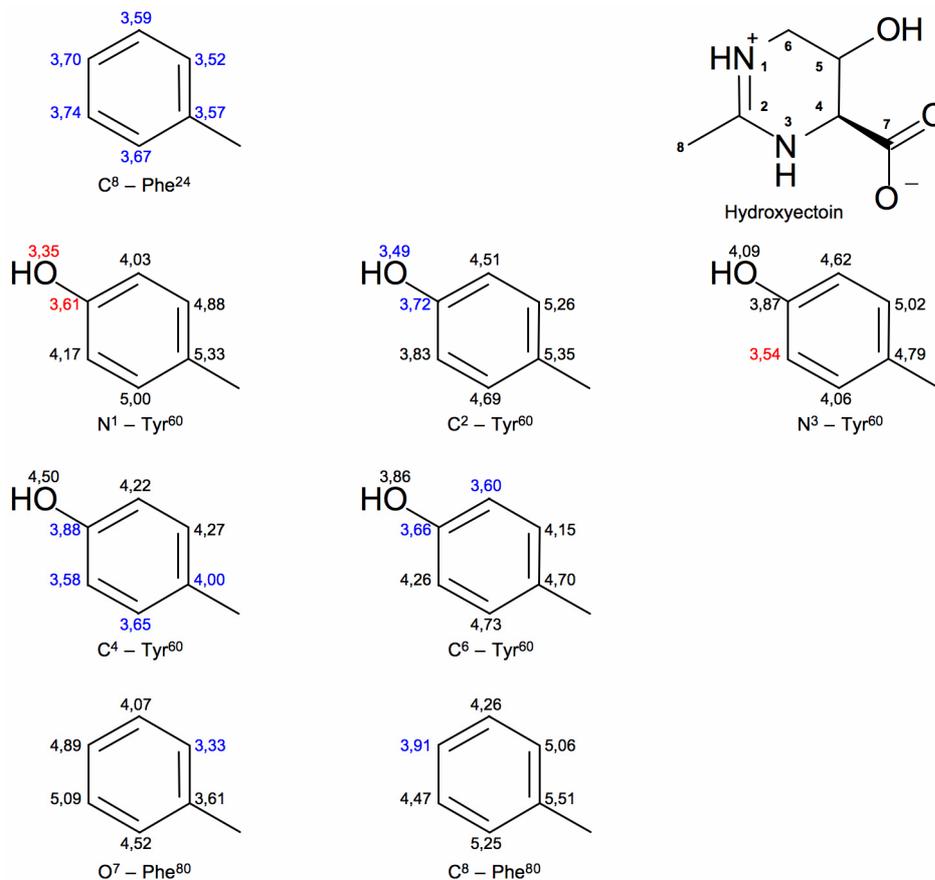


Abb. 3.24: van der Waals Kontakte zwischen dem Substrat Hydroxyectoin und den aromatischen Systemen der Reste Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> des Substratbindepoteins EhuB. Gezeigt sind die Distanzen zwischen den angegebenen Atomen des Substrats und den einzelnen Atomen der mit dem Substrat in Kontakt stehenden aromatischen Systeme der Reste Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup>. Die Distanzen der mit den Stickstoffatomen N<sup>1</sup> oder N<sup>3</sup> bzw. den sonstigen Atomen des Substrats in Kontakt stehenden Atome des Proteins sind rot bzw. blau eingefärbt. Die verwendeten van der Waals Radien der entsprechenden Atome beruhen auf Literaturangaben (Li und Nussinov, 1998).

Die in Abb. 3.25 wiedergegebene Überlagerung der für die Substratbindung relevanten Abschnitte der Polypeptidkette von EhuB zeigt für die Strukturen im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin keine signifikanten Unterschiede in der dreidimensionalen Anordnung der bedeutsamen Reste.

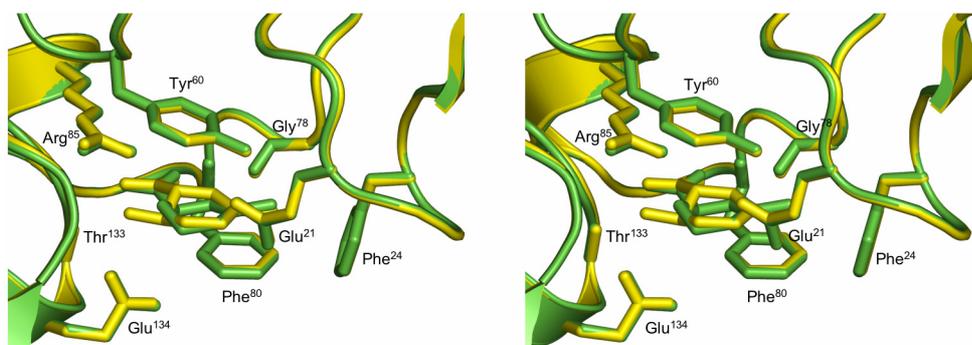


Abb. 3.25: Überlagerung der Substratbindungsstellen von EhuB im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin. Die Stereoabbildung zeigt die relevanten Teile der Polypeptidkette von EhuB, wobei die Strukturen von EhuB im Komplex mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin in grün bzw. gelb wiedergegeben sind. Das entsprechende Substrat und die mit ihm wechselwirkenden Reste sind als „stick“ Modelle dargestellt.

Dieses spiegelt sich auch in den bei der Überlagerung erhaltenen Distanzen zwischen den strukturell identischen Resten wider, die 0,04 Å bis 0,18 Å betragen. Der einzige wesentliche Unterschied der beiden Strukturen, den die Überlagerung erneut verdeutlicht, ist die in der Struktur mit gebundenem Hydroxyectoin gefundene Wechselwirkung der Seitenkette von Glu<sup>134</sup> mit der lediglich in diesem Substrat vorhandenen Hydroxyl-Gruppe.

## 4 Diskussion

ABC-Transporter werden in allen drei Reichen des Lebens gefunden und stellen eine der größten Familien von aktiven Transportern dar (Ames et al., 1990; Higgins, 1992; Higgins und Linton, 2003). Sie sind an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge beteiligt. Im Menschen beispielsweise sind sie an der adaptiven Immunabwehr (Schmitt und Tampe, 2000) ebenso beteiligt wie an der Freisetzung von Insulin (Matsuo et al., 2003). Weiterhin ist die (Fehl-) Funktion bestimmter humaner ABC-Transporter die Ursache für die Entstehung von Erbkrankheiten (z.B. Mukoviszidose) und anderer pathophysiologischer Zustände, wie der Entwicklung einer „multidrug resistance“, die ein wesentliches Hindernis in der Chemotherapie vieler menschlicher Tumore darstellt. Im Unterschied zu den Eukaryoten, bei denen ausschließlich ABC-Transporter mit einer Export Funktion existieren, umfasst diese Proteinfamilie in Prokaryoten auch aktive Transportsysteme zur spezifischen Aufnahme unterschiedlichster Substanzen.

Auf Grund der Bedeutung der ABC-Transporter für eine Vielzahl zellulärer Vorgänge wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgewählte Vertreter dieser Familie von aktiven Transportern strukturbioologisch untersucht, um zur Aufklärung ihres molekularen Mechanismus beizutragen. Es wurde einerseits der MDR-ABC-Transporter LmrA aus *L. lactis* untersucht, der auf Grund seiner funktionalen Austauschbarkeit mit dem humanen P-Glykoprotein (van Veen et al., 1998) ein optimales Modellsystem zur strukturellen Untersuchung dieser medizinisch relevanten Klasse von aktiven Transportern darstellt. Andererseits wurde das Substratbindeprotein EhuB aus *S. meliloti* strukturell charakterisiert, was die molekularen Grundlagen der Substratspezifität des für den Import der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin verantwortlichen ABC-Transporters Ehu aufklärte.

### 4.1 Der MDR-ABC-Transporter LmrA

Zur strukturellen Charakterisierung der häufig an der Entstehung einer „multidrug resistance“ beteiligten MDR-ABC-Transporter wurde im Rahmen dieser Arbeit der bakterielle ABC-Transporter LmrA aus *L. lactis* als Modellsystem für diese medizinisch relevante Klasse von aktiven Transportern verwendet. Die Grundlage hierfür bildete die funktionale Austauschbarkeit (van Veen et al., 1998) von LmrA mit dem Prototypen dieser Klasse von ABC-Transportern, dem humanen P-Glykoprotein.

Auf Grund der erheblichen Schwierigkeiten bei der Kristallisation von Membranproteinen für die Röntgenstrukturanalyse (Ostermeier und Michel, 1997) wurde für LmrA nach der Auswertung der relevanten Literatur ein Ansatz entwickelt, der das Ziel hatte die Chancen einer erfolgreichen Strukturbestimmung zu erhöhen. Die Grundelemente dieses Ansatzes waren einerseits die Suche nach einer für die Kristallisation von LmrA geeigneten Proteinpräparation und andererseits die breit angelegte Analyse des n-dimensionalen Kristallisationsrau-

mes dieses Membranproteins. Bei der Suche nach einer geeigneten Proteinpräparation wurde besonders der Einfluss der zur Reinigung von LmrA in Protein-Detergens-Komplexen verwendeten Detergenzien untersucht. Die Gründe hierfür waren erstens der für zahlreiche Beispiele gezeigte Einfluss des Detergens auf die Monodispersität und Stabilität von Membranproteinen (Engel et al., 2002; Lemieux et al., 2002; Li et al., 2001), die ihrerseits für die Bildung von geordneten dreidimensionalen Kristallen von Bedeutung zu sein schienen (Lemieux et al., 2002). Zweitens war in diesem Zusammenhang auch der Einfluss der Detergensmizellen auf die zur Bildung geordneter dreidimensionaler Kristalle essentieller Protein-Protein Interaktionen zu berücksichtigen (Michel, 1991). Vor dem Hintergrund der sich abzeichnenden Bedeutung der Lipide für die Kristallisation von Membranproteinen (Lemieux et al., 2002; Nussberger et al., 1993; Toyoshima et al., 2000; Yu et al., 1996) wurde weiterhin versucht durch Verwendung eines minimalen Reinigungsprotokolls eine möglichst große Zahl an mit dem Membranprotein assoziierten endogenen Lipiden zu erhalten.

#### **4.1.1 Die Eignung verschiedener LmrA Präparationen für die Kristallisation**

Die im Zuge der Suche nach einer zur Kristallisation von LmrA geeigneten Präparation erhaltenen Protein-Detergens-Kombinationen zeigten, wie erwartet, eine unterschiedliche Eignung für strukturbiochemische Untersuchungen. Die Bewertung des Nutzens der Präparationen für die Kristallisation von LmrA erfolgte auf Grundlage ihrer Monodispersität und Stabilität, die wichtige Parameter für die Bildung von geordneten dreidimensionalen Kristallen sind (Garavito et al., 1996) und die im Wesentlichen auf Basis der Chromatogramme der Gelfiltrationsläufe beurteilt wurden. Die Gründe für die unterschiedlichen Molekulargewichte der bei der Gelfiltrationschromatographie beobachteten Hauptsignale der einzelnen Präparationen sind nicht bekannt. Ein möglicher Grund könnte der unterschiedliche hydrodynamische Radius der Protein-Detergens-Komplexe sein. Weiterhin ist vorstellbar, dass sich die einzelnen Präparationen in der Zahl der mit dem Membranprotein assoziierten endogenen Lipide unterscheiden und aus diesem Grund ein unterschiedliches Laufverhalten zeigten.

Die im Kapitel 3.1.2 in der ersten Gruppe zusammengefassten Detergenzien sind vor dem Hintergrund ihrer fehlenden Fähigkeit signifikante Proteilmengen zu reinigen nicht für die Kristallisation von LmrA geeignet. In ähnlicher Weise scheinen auch die Vertreter der zweiten Gruppe von Detergenzien auf Grund der Heterogenität ihrer Präparationen bei Analyse mittels Gelfiltrationschromatographie für Kristallisationsexperimente ungeeignet zu sein.

Die in der dritten Gruppe zusammengefassten Detergenzien zeigten bei Untersuchung ihrer Präparationen mittels Gelfiltrationschromatographie am ersten sowie am siebten Tag nach der Reinigung ein Hauptsignal im Ausschlussvolumen, wie das in *Abb. 3.2* beispielhaft gezeigte Tetradecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid verdeutlicht. Dieses Laufverhalten, dass das gemeinsame Merkmal aller Präparationen dieser Gruppe von Detergenzien war, deutet stark auf eine Aggregation von LmrA hin, weshalb auch diese Präparationen ungeeignet für die Kristallisation von LmrA zu sein scheinen.

Die in *Abb. 3.3* bis *Abb. 3.8* dargestellten Charakterisierungen ausgewählter Vertreter der vierten Gruppe von Detergenzien veranschaulichen ihre unterschiedliche Eignung für die Kristallisation von LmrA. Die unter Verwendung der Detergenzien Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (*Abb. 3.4*), FOS-CHOLINE-12 (*Abb. 3.5*) und FOS-CHOLINE-14 (*Abb. 3.3*) gewonnenen Präparationen ergaben im Rahmen ihrer Analyse mittels Gelfiltrationschromatographie an beiden untersuchten Zeitpunkten ein Hauptsignal außerhalb des Ausschlussvolumens sowie einige weitere Signale. Die signifikante Zahl an Signalen neben dem Hauptsignal zeigt dabei ein gewisses Maß an Heterogenität der untersuchten Präparationen. Weiterhin sprechen die Veränderungen der Chromatogramme der unter Verwendung von Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid und FOS-CHOLINE-14 erhaltenen Präparationen bei ihrer Lagerung für eine Instabilität dieser Protein-Detergenzien-Kombinationen. Die genannten Präparationen scheinen auf Grund ihrer Heterogenität und den teilweise vorhandenen Hinweisen auf eine Instabilität weitgehend ungeeignet für die Kristallisation von LmrA zu sein.

Ein anderes Bild ergab die Charakterisierung der unter Verwendung von Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid, Zwittergent 3-14 und Zwittergent 3-16 erhaltenen Präparationen, die in *Abb. 3.6*, *Abb. 3.7* und *Abb. 3.8* gezeigt sind. Die Analyse dieser Präparationen mittels Gelfiltrationschromatographie zeigte an beiden untersuchten Zeitpunkten ein Hauptsignal außerhalb des Ausschlussvolumens der Gelfiltrationssäule sowie ein deutlich schwächeres Signal im Ausschlussvolumen, was bei den meisten Vertretern der vierten Gruppe von Detergenzien beobachtet wurde. Auf den ersten Blick deutet das beschriebene Laufverhalten der Präparationen auf eine Aggregation von LmrA hin. Gegen diese Interpretation spricht jedoch die Tatsache, dass die Intensität des Signals im Ausschlussvolumen bei Lagerung in der Regel abnahm, während die Intensität des Hauptsignals zunahm. Zusammenfassend kann die Identität des Signals im Ausschlussvolumen auf Grundlage der verfügbaren Daten nicht eindeutig geklärt werden. Die beschriebenen Präparationen scheinen jedoch trotz des zusätzlichen Signals im Ausschlussvolumen auf Grund ihres ausgeprägten Hauptsignals für die Kristallisation von LmrA geeignet zu sein, wobei in dieser Gruppe von Detergenzien die unter Verwendung von Zwittergent 3-16 erhaltene Präparation die aussichtsreichste Protein-Detergenzien-Kombination zu sein scheint.

Die besten Chancen für die Bildung von geordneten dreidimensionalen Kristallen scheint jedoch die unter Verwendung von FOS-CHOLINE-16 erhaltene Präparation zu bieten, deren Charakterisierung in *Abb. 3.9* wiedergegeben ist. Hierfür sprechen die Ergebnisse der Analyse per Gelfiltrationschromatographie, die sowohl die Monodispersität als auch die Stabilität dieser Präparation zeigen. Die Analyse dieser Präparation ergab am ersten Tag nach der Reinigung ein Hauptsignal mit einem Molekulargewicht von 530 kDa sowie ein deutlich schwächeres Signal im Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule. Im Unterschied dazu lieferte die erneute Analyse der Präparation am siebten Tag nach der Reinigung lediglich ein Signal mit einem Molekulargewicht von 530 kDa, was die Monodispersität und Stabilität dieser Präparation belegt.

#### 4.1.2 Die Reinigung von LmrA aus *L. lactis*

Eine wesentliche Voraussetzung für die Kristallisation von Membranproteinen, wie dem MDR-ABC-Transporter LmrA, ist die Verfügbarkeit von ausreichenden Mengen einer reinen, monodispersen und – über einen hinreichenden Zeitraum – stabilen Proteinlösung. Die beiden letzten dieser für die Kristallisation von LmrA wichtigen Eigenschaften erfüllte die unter Verwendung von FOS-CHOLINE-16 erhaltene Präparation. Der nächste Schritt auf dem Weg zur Kristallisation von LmrA bestand somit in der Erhöhung der Reinheit und der Steigerung der Ausbeute dieser Präparation.

Eine signifikante Steigerung der Reinheit der Präparation bis zur Homogenität konnte, wie *Abb. 3.10* zeigt, durch die Verwendung von Proteaseinhibitoren erreicht werden. Eine Erhöhung der Ausbeute gelang einerseits durch die Verwendung einer größeren Menge an Bakterien als Ausgangsmaterial und andererseits durch die Verwendung einer größeren Zahl an HiTrap Chelating Säulen zur Affinitätsreinigung von LmrA. Weiterhin wurde im Interesse eines besser definierten Verhältnisses des Membranproteins LmrA zu den gleichzeitig gereinigten endogenen Lipiden bei einem konstanten Protein zu Detergens Verhältnis solubilisiert. Dies erscheint besonders im Licht der sich in den letzten Jahren mehrenden Befunde über die Bedeutung der Lipide für die Kristallisation von Membranproteinen sinnvoll (Lemieux et al., 2002; Lemieux et al., 2003; Long et al., 2005; Zhang et al., 2003).

Das auf diese Weise erhaltene Reinigungsprotokoll ergab eine bis zur Homogenität gereinigte, stabile und monodisperse Präparation von LmrA mit einer Ausbeute von 0,7 bis 1,0 mg pro Liter Kulturvolumen. Dieses stellt eine wesentliche Verbesserung gegenüber dem bisher veröffentlichten Reinigungsprotokoll dar (Margolles et al., 1999) und sollte ein optimaler Ausgangspunkt für die Kristallisation von LmrA sein.

#### 4.1.3 Die Kristallisation des MDR-ABC-Transporters LmrA

Nachdem eine geeignete Präparation zur Kristallisation von LmrA gefunden war, bestand der nächste Schritt in der breit angelegten Analyse des n-dimensionalen Kristallisationsraums. Hierfür wurden in Bezug auf die dazu verwendeten Kristallisationslösungen zwei unterschiedliche Wege gewählt. Erstens wurden fünf kommerziell erhältliche „sparse matrix screens“ verwendet, die aus einer Vielzahl erfolgreich zur Kristallisation von Membranproteinen eingesetzter Lösungen bestehen. In einem zweiten, systematischeren Ansatz wurden im Unterschied dazu eine Reihe von selbst entwickelten „grid screens“ verwendet. Die Grundlage zur Entwicklung dieser Kristallisationslösungen bildete dabei die Analyse der Kristallisationsbedingungen von Membranproteinen.

Im Zuge der Suche nach Bedingungen zur Kristallisation von LmrA wurden insgesamt 9600 Bedingungen bei unterschiedlichen Temperaturen analysiert, woraus vier verschiedene Kristallformen resultierten. Der Vergleich der in *Tab. 3.4* dargestellten Kristallisationsbedingungen zeigt, dass alle Kristallformen bei einem pH-Wert von 5,6 erhalten wurden. Dieser pH-Wert liegt nur 0,3 Einheiten unter dem mit Hilfe von ProtParam ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) berechneten isoelektrischen Punkt von LmrA, an dem seine Löslichkeit am geringsten ist. Die Bedeu-

tung des pH-Werts für die Kristallisation von LmrA kann jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht abschließend beurteilt werden, da die experimentelle Bestimmung des isoelektrischen Punktes noch aussteht.

Bei der Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen war die schlechte Reproduzierbarkeit der Kristallbildung ein wesentliches Hindernis für die Verbesserung der Qualität der Kristalle. Diese Situation konnte auch durch intensive Bemühungen, bei denen die für die Kristallisation wichtigsten Faktoren untersucht wurden, nicht verbessert werden. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass der Grund für die beschriebenen Schwierigkeiten nicht in der Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen sondern auf Seiten der Proteinpräparation zu suchen ist. Eine mögliche Ursache der beschriebenen Probleme könnte, trotz der in dieser Richtung unternommenen Bemühungen, ein nicht konstantes Verhältnis von LmrA und den mit ihm assoziierten endogenen Lipiden sein. Unterstützt wird diese Vermutung von der in den letzten Jahren steigenden Zahl an Membranproteinstrukturen, bei deren Bestimmung die mit dem Membranprotein gereinigten endogenen Lipide (Huang et al., 2003; Lemieux et al., 2003) oder extern zugesetzte Lipide (Kurisu et al., 2003; Long et al., 2005; Toyoshima et al., 2000; Zhang et al., 2003) von entscheidender Bedeutung für den Kristallisationsprozess waren. Ein weiterer kritischer Faktor könnte das Detergens zu Protein Verhältnis sein, das im Zuge der Konzentrierung von Membranproteinen, auf die für die Kristallisation typischerweise benötigten Werte häufig durch die gleichzeitige Anreicherung des verwendeten Detergens, ansteigt (Dahout-Gonzalez et al., 2003). Die Bedeutung der Kontrolle des Detergens zu Protein Verhältnisses für die Kristallisation von Membranproteinen zeigt unter anderem die erfolgreiche Strukturbestimmung des ADP/ATP Carriers (Pebay-Peyroula et al., 2003), bei der die Senkung des Detergens zu Protein Verhältnisses essentiell für die Kristallbildung war (Dahout-Gonzalez et al., 2003).

Die Datenaufnahme unter Verwendung von Synchrotronstrahlung ergab für keine der vier Kristallformen einen Hinweis auf Salz- oder Detergenskristalle. Weiterhin zeigte die Kristallform 2 bei geeigneten Parametern eine schwache Streuung bis zu einer Auflösung von etwa 20 Å, wobei das gewonnene Beugungsbild für Proteinkristalle spricht. Die Kristallform 2 bildet somit einen erfolversprechenden Ausgangspunkt für die weitere Optimierung der Kristallisationsbedingungen, die bei einer Verbesserung der Streuqualität und Reproduzierbarkeit in der Strukturbestimmung von LmrA resultieren könnten.

#### **4.1.4 Ausblick**

Die Strukturbestimmung des MDR-ABC-Transporters LmrA erfordert, wie bereits angedeutet, eine deutliche Verbesserung der Streuqualität und Reproduzierbarkeit der bisher erhaltenen Kristallformen. Auf Grund der im letzten Abschnitt diskutierten Zusammenhänge erscheint es daher sinnvoll, erstens, vor dem Hintergrund des für GlpT (Huang et al., 2003; Lemieux et al., 2003) beschriebenen Einflusses der mit dem Membranprotein gereinigten endogenen Lipide auf die Kristallbildung, die mit LmrA gereinigten Lipide zu analysieren und eventuell das Lipid zu Protein Verhältnis zu kontrollieren. Zweitens sollte der Einfluss

von extern zugesetzten Lipiden während der Kristallisation und/oder Reinigung untersucht werden, was für die erfolgreiche Strukturbestimmung der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Toyoshima et al., 2000), dem Cytochrom  $b_6f$  Komplex (Kurisu et al., 2003; Zhang et al., 2003) und dem Komplex des Kv1.2  $\text{K}^+$  Kanals und seiner  $\beta 2$ -Untereinheit (Long et al., 2005) von entscheidender Bedeutung war. Drittens erscheint es sinnvoll das Detergens zu Protein Verhältnis zu bestimmen und gegebenenfalls durch die Entfernung von Detergens zu senken, wobei die Kristallisation von GlpT (Lemieux et al., 2003) und dem ADP/ATP Carrier (Dahout-Gonzalez et al., 2003) die Bedeutung dieses Faktors für die Bildung von Membranproteinkristallen verdeutlichen.

Neben den beschriebenen Ansätzen stehen noch eine Reihe weiterer Methoden zur Verfügung, die bereits zur erfolgreichen Strukturbestimmung von Membranproteinen beigetragen haben. Ein Ansatz ist beispielsweise die Kristallisation des Membranproteins im Komplex mit einem spezifischen Inhibitor, was im Fall von LacY (Abramson et al., 2003), dem ADP/ATP Carrier (Dahout-Gonzalez et al., 2003; Pebay-Peyroula et al., 2003) und dem Cytochrom  $bc_1$  Komplex (Hunte et al., 2000) zur erfolgreichen Strukturbestimmung beigetragen hat. Die Kristallisation eines Membranproteins im Komplex mit einem  $F_v$  oder  $F_{ab}$  Antikörper Fragment ist ein weiterer Ansatz Kristalle dieser Proteinklasse zu erhalten oder ihre Streuqualität zu verbessern (Hunte und Michel, 2002). Die erfolgreiche Strukturbestimmung der Cytochrom  $c$  Oxidase (Iwata et al., 1995; Ostermeier et al., 1995) und des Cytochrom  $bc_1$  Komplexes (Hunte et al., 2000) mit einem gebundenen Antikörper  $F_v$  Fragment sowie des KcsA (Zhou et al., 2001) und des KvAP (Jiang et al., 2003)  $\text{K}^+$ -Kanals im Komplex mit einem Antikörper  $F_{ab}$  Fragment demonstrieren dabei das Potential dieses Ansatzes. Weiterhin zeigt die Kristallisation von GlpT (Huang et al., 2003; Lemieux et al., 2003) und der Fumarat Reduktase (Lancaster et al., 1999), dass die Streuqualität von Membranproteinkristallen auch durch die Verwendung von Detergensmischungen verbessert werden kann.

## 4.2 Das Substratbindeprotein EhuB

In einem ersten Schritt, um die Aufnahme von kompatiblen Soluten auf molekularer Ebene zu verstehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die für die Substratspezifität des ABC-Importers Ehu aus *S. meliloti* verantwortlichen Faktoren untersucht. Hierfür wurde die Struktur des wesentlich für die Substratspezifität des Systems (Boos und Lucht, 1996) verantwortlichen Substratbindeproteins EhuB im Komplex mit einem seiner Substrate Ectoin bzw. Hydroxyectoin bestimmt und die für die Bindung der Substrate verantwortlichen Wechselwirkungen analysiert.

### 4.2.1 Molekulare Grundlagen der Substratspezifität von EhuB

Die Struktur von EhuB im Komplex mit Ectoin (*Abb. 3.20A*) bzw. Hydroxyectoin (*Abb. 3.20B*) zeigt, dass sich die Substratbindungsstelle, wie auf Grundlage anderer Strukturen von Substratbindeproteinen erwartet (Wilkinson und Verschueren, 2003), in der Spalte zwischen den beiden Domänen des Proteins befindet. Die Substrate Ectoin bzw. Hydroxyectoin werden in der Bindungsstelle mit Hilfe von sieben bzw. acht Aminosäureresten des Proteins gebunden. Die gebundenen Substrate scheinen dabei, auf Grund ihrer in *Abb. 3.21* bzw. *Abb. 3.23* dargestellten Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein, in ihrer zwitterionischen Form vorzuliegen. Diese Annahme wird von Untersuchungen unterstützt, die zeigen, dass Ectoin und Hydroxyectoin in Lösung sowie im Kleinmolekülkristall in ihrer zwitterionischen Form existieren (Inbar et al., 1993).

Die Analyse der an der Bindung der Substrate beteiligten Reste in der Kristallstruktur von EhuB zeigt (siehe Kapitel 3.2.7), dass diese das Substrat mittels unterschiedlicher Arten von Wechselwirkungen binden. Die Interaktion mit der negativ geladenen Carboxylat-Gruppe der Substrate erfolgt durch die Bildung von Salzbrücken mit der Seitenkette von Arg<sup>85</sup> sowie mittels Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hauptketten Stickstoffatomen von Phe<sup>80</sup> und Thr<sup>133</sup>. Im Unterschied dazu sind für die Wechselwirkung mit dem kationischen Anteil der Substrate wesentlich die aromatischen Systeme der Reste Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> verantwortlich, die das Substrat von drei Seiten einschließen. Diese Art der Wechselwirkung des kationischen Anteils eines Substrats mit räumlich entsprechend angeordneten aromatischen Resten des Proteins wurde auch für die Substratbindeproteine ProX aus *E.coli* (Schiefner et al., 2004a), ProX aus *A. fulgidus* (Schiefner et al., 2004b) und OpuAC aus *B. subtilis* (Horn et al., 2006) beschrieben.

| Punktmutation<br>zu Aminosäure | Phe <sup>24</sup> |         | Tyr <sup>60</sup> |         | Phe <sup>80</sup> |         |
|--------------------------------|-------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|---------|
|                                | K <sub>D</sub>    | S.D.    | K <sub>D</sub>    | S.D.    | K <sub>D</sub>    | S.D.    |
| Wildtyp                        | 1,6 µM            | 0,3 µM  | 1,6 µM            | 0,3 µM  | 1,6 µM            | 0,3 µM  |
| Ala                            | 1,3 µM            | 0,6 µM  | 6,0 µM            | 2,0 µM  | –                 | –       |
| Phe                            | Wildtyp           | Wildtyp | 2,1 µM            | 1,1 µM  | Wildtyp           | Wildtyp |
| Tyr                            | < 0,02 µM         | n.b.    | Wildtyp           | Wildtyp | < 0,15 µM         | n.b.    |
| Trp                            | < 0,02 µM         | n.b.    | < 0,11 µM         | n.b.    | < 0,06 µM         | n.b.    |
| Glu                            | 6,7 µM            | 2,3 µM  | –                 | –       | 43,0 µM           | 3,0 µM  |
| Asp                            | 1,4 µM            | 0,3 µM  | –                 | –       | 6,5 µM            | 0,6 µM  |
| Phe <sup>24</sup> →Ala         | –                 | –       | –                 | –       | keine Mutante     |         |
| Tyr <sup>60</sup> →Ala         |                   |         |                   |         |                   |         |

Tab. 4.1: Dissoziationskonstanten von unterschiedlichen EhuB Konstrukten für ihr Substrat Ectoin und ihre Standardabweichungen (entnommen aus (Höing, 2005)). Die verwendeten Symbole und Abkürzungen bedeuten: – : keine Bindung bis zu einer Substratkonzentration von 500 µM  
< : Dissoziationskonstante liegt unterhalb des Messbereichs  
n.b. : nicht bestimmt  
S.D. : Standardabweichung (engl. standard deviation)

Für diese Proteine wird angenommen, dass die beschriebenen Wechselwirkungen zu großen Teilen auf Kation- $\pi$  und van der Waals Interaktionen beruhen. Auf Grund der ähnlichen Anordnung der aromatischen Reste und funktionalen Daten, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. E. Bremer (Universität Marburg) gewonnen wurden und in Tab. 4.1 für Ectoin und Tab. 4.2 für Hydroxyectoin gezeigt sind (Hanekop et al., Manuskript in Vorbereitung), scheinen diese Interaktionen auch für die Substratbindung von EhuB entscheidend zu sein.

| Punktmutation<br>zu Aminosäure | Phe <sup>24</sup> |         | Tyr <sup>60</sup> |         | Phe <sup>80</sup> |         |
|--------------------------------|-------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|---------|
|                                | K <sub>D</sub>    | S.D.    | K <sub>D</sub>    | S.D.    | K <sub>D</sub>    | S.D.    |
| Wildtyp                        | 0,45 µM           | 0,05 µM | 0,45 µM           | 0,05 µM | 0,45 µM           | 0,05 µM |
| Ala                            | 0,35 µM           | 0,07 µM | 1,3 µM            | 0,4 µM  | –                 | –       |
| Phe                            | Wildtyp           | Wildtyp | 1,1 µM            | 0,3 µM  | Wildtyp           | Wildtyp |
| Tyr                            | < 0,02 µM         | n.b.    | Wildtyp           | Wildtyp | < 0,04            | n.b.    |
| Trp                            | < 0,04 µM         | n.b.    | 0,16 µM           | 0,02 µM | < 0,10            | n.b.    |
| Glu                            | 2,5 µM            | 1,5 µM  | –                 | –       | 94,0 µM           | 23,0 µM |
| Asp                            | 5,1 µM            | 0,8 µM  | –                 | –       | 59,0 µM           | 8,0 µM  |
| Phe <sup>24</sup> →Ala         | –                 | –       | –                 | –       | keine Mutante     |         |
| Tyr <sup>60</sup> →Ala         |                   |         |                   |         |                   |         |

Tab. 4.2: Dissoziationskonstanten von unterschiedlichen EhuB Konstrukten für ihr Substrat Hydroxyectoin und ihre Standardabweichungen (entnommen aus (Höing, 2005)). Für die Erläuterung der verwendeten Symbole und Abkürzungen siehe Tab. 4.1.

Die Bedeutung der von den aromatischen Resten Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> ausgehenden Interaktionen für die Substratbindung verdeutlicht die nicht messbare Affinität von EhuB zu seinen Substraten bei der Substitution von Phe<sup>80</sup> durch Alanin, das nicht zur Wechselwirkung mit der delokalisierten positiven Ladung der Substrate befähigt ist. Der Verlust der Substratbindung bei Austausch von Phe<sup>24</sup> und Tyr<sup>60</sup> durch Alanin und die Zunahme der Bindungsaffinität von EhuB für seine Substrate bei Substitution einer der aromatischen Reste durch Tyrosin oder Tryptophan unterstreichen den wesentlichen Beitrag der beschriebenen Wechselwirkungen an der Substratbindung. Der letzte Punkt verdeutlicht dabei gleichzeitig den erheblichen Einfluss des aromatischen Restes auf die Stärke seiner Wechselwirkung mit

der delokalisierten positiven Ladung des Substrats. Eine mögliche Erklärung hierfür liefern *ab initio* 6-31G\*\* Rechnungen von Indol, Phenol und Benzol (Dougherty, 1996), die die Seitenketten von Tryptophan-, Tyrosin- bzw. Phenylalanin-Resten bilden. Diese Modellrechnungen zeigen, dass Indol eine deutlich größere und intensivere Region negativen elektrostatischen Potentials als Phenol oder Benzol besitzt und deshalb stärkere Wechselwirkungen mit Kationen ausbilden kann. Ferner ergibt der Vergleich der elektrostatischen Potentialkarten von Phenol und Benzol, dass Phenol mit seinem Sauerstoffatom eine zweite Region negativen elektrostatischen Potentials besitzt, die zu einer stärkeren Interaktion mit Kationen beitragen kann.

Weiterhin zeigt die Abnahme der Bindungsaffinität von EhuB für seine Substrate bei Substitution von Phe<sup>24</sup> bzw. Phe<sup>80</sup> durch Aspartat oder Glutamat, dass die negativ geladenen Seitenketten dieser Reste teilweise in der Lage sind die Wechselwirkungen der aromatischen Reste mit der delokalisierten positiven Ladung der Substrate zu ersetzen. Der Verlust der Substratbindung bei Austausch von Tyr<sup>60</sup> durch Aspartat oder Glutamat scheint im Unterschied dazu eine Konsequenz elektrostatischer Abstoßung zu sein, da die Hydroxyl-Gruppe von Tyr<sup>60</sup> normalerweise eine Wasserstoffbrückenbindung mit Glu<sup>21</sup> bildet.

Die Bindung des kationischen Anteils der Substrate durch EhuB erfolgt neben den beschriebenen Interaktionen mit den aromatischen Resten Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> durch die Bildung zweier Salzbrücken mit der Seitenkette von Glu<sup>21</sup> sowie einer Wasserstoffbrückenbindung mit der Hauptketten Carbonyl-Funktion von Gly<sup>78</sup>.

Bei der Bindung des Substrats Hydroxyectoin wird im Unterschied zu Ectoin eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette von Glu<sup>134</sup> und der lediglich in diesem Substrat vorhandenen Hydroxyl-Gruppe beobachtet. Diese zusätzliche Interaktion des Proteins mit dem Substrat scheint auf Grund des aus *Abb. 3.25* ersichtlichen Fehlens signifikanter Unterschiede der Substratbindungsstellen für die etwa dreieinhalbfach höhere Bindungsaffinität ( $K_D=0,45 \pm 0,05 \mu\text{M}$  gegenüber  $1,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ) von EhuB für Hydroxyectoin gegenüber Ectoin verantwortlich zu sein.

Zusammenfassend scheint die Substratspezifität von EhuB eine Konsequenz aus einer Reihe von Wechselwirkungen zwischen dem Protein und seinen Substraten zu sein. Die Interaktion mit der negativ geladenen Carboxylat-Gruppe der Substrate erfolgt dabei durch die Bildung von Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen. Im Unterschied dazu sind für die Bindung des kationischen Anteils der Substrate wesentlich die wahrscheinlich auf Kation- $\pi$  und van der Waals Interaktionen beruhenden Wechselwirkungen mit den aromatischen Resten Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> verantwortlich, die durch ihre räumliche Anordnung eine optimale Bindungsstelle für die delokalisierte positive Ladung der Substrate bilden. Zusätzlich zu diesen Wechselwirkungen wird der kationische Anteil der Substrate durch die Bildung zweier Salzbrücken und einer Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert.

Die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Resten Phe<sup>24</sup>, Tyr<sup>60</sup> und Phe<sup>80</sup> und dem kationischen Anteil der Substrate (Hanekop et al., Manuskript in Vorbereitung) zeigt erstens durch den Verlust der Substratbindung bei Substitution von Phe<sup>80</sup>

bzw. Phe<sup>24</sup> und Tyr<sup>60</sup> durch Alanin die Bedeutung von Phe<sup>80</sup> und mindestens einem weiteren der verbleibenden aromatischen Reste für die Substratbindung. Zweitens verdeutlicht die Zunahme der Bindungsaffinität des Proteins für seine Substrate bei Substitution einer der aromatischen Reste durch Tyrosin oder Tryptophan den Einfluss des aromatischen Systems auf die Stärke der Wechselwirkung mit dem kationischen Anteil der Substrate. Drittens zeigt die Abnahme der Affinität von EhuB zu seinen Substraten beim Austausch von Phe<sup>24</sup> oder Phe<sup>80</sup> durch Aspartat oder Glutamat die Möglichkeit die beschriebenen Wechselwirkungen wenigstens teilweise durch die negativ geladenen Seitenketten von Aspartat- oder Glutamat-Resten zu ersetzen.

#### 4.2.2 Struktureller Vergleich von kompatible Solute bindenden Substratbindeproteinen

Zur Untersuchung der strukturellen Übereinstimmung der für kompatible Solute spezifischen Substratbindeproteine wurde die Struktur von EhuB im Komplex mit Ectoin mit den Prolin-Betain gebundenen Strukturen von ProX aus *E. coli* und *A. fulgidus* (Proteindatenbank Zugangscode 1R9Q bzw. 1SW1), sowie OpuAC aus *B. subtilis* (Proteindatenbank Zugangscode 2B4M) unter Verwendung eines „global superposition-distance-based Needleman-Wunsch“-Algorithmus überlagert. Hierfür wurde der im Programm LSQMAN implementierte Algorithmus mit einem Distanzschwellenwert von 3,5 Å verwendet.

Die in Abb. 4.1 dargestellte Überlagerung der C<sub>α</sub>-Positionen von EhuB aus *S. meliloti* (in blau) mit ProX aus *E. coli* (in rot), ProX aus *A. fulgidus* (in grün) und OpuAC aus *B. subtilis* (in gelb) zeigt neben der gemeinsam zugrunde liegenden Faltung – einer Substratbindeprotein Faltung der Gruppe II – deutliche strukturelle Unterschiede. Letztere verdeutlicht die vergleichsweise geringe Zahl der strukturell äquivalenten Reste. Die Überlagerung der 256 Reste von EhuB mit ProX aus *E. coli*, ProX aus *A. fulgidus* und OpuAC aus *B. subtilis* ergibt lediglich 134, 137 und 122 strukturell äquivalente Reste. Im Gegensatz dazu liefert die Überlagerung der 270 bzw. 269 Reste von ProX aus *A. fulgidus* bzw. OpuAC aus *B. subtilis* mit ProX aus *E. coli* 214 bzw. 251 strukturell äquivalente Reste (Horn et al., 2006; Schiefner et al., 2004b).

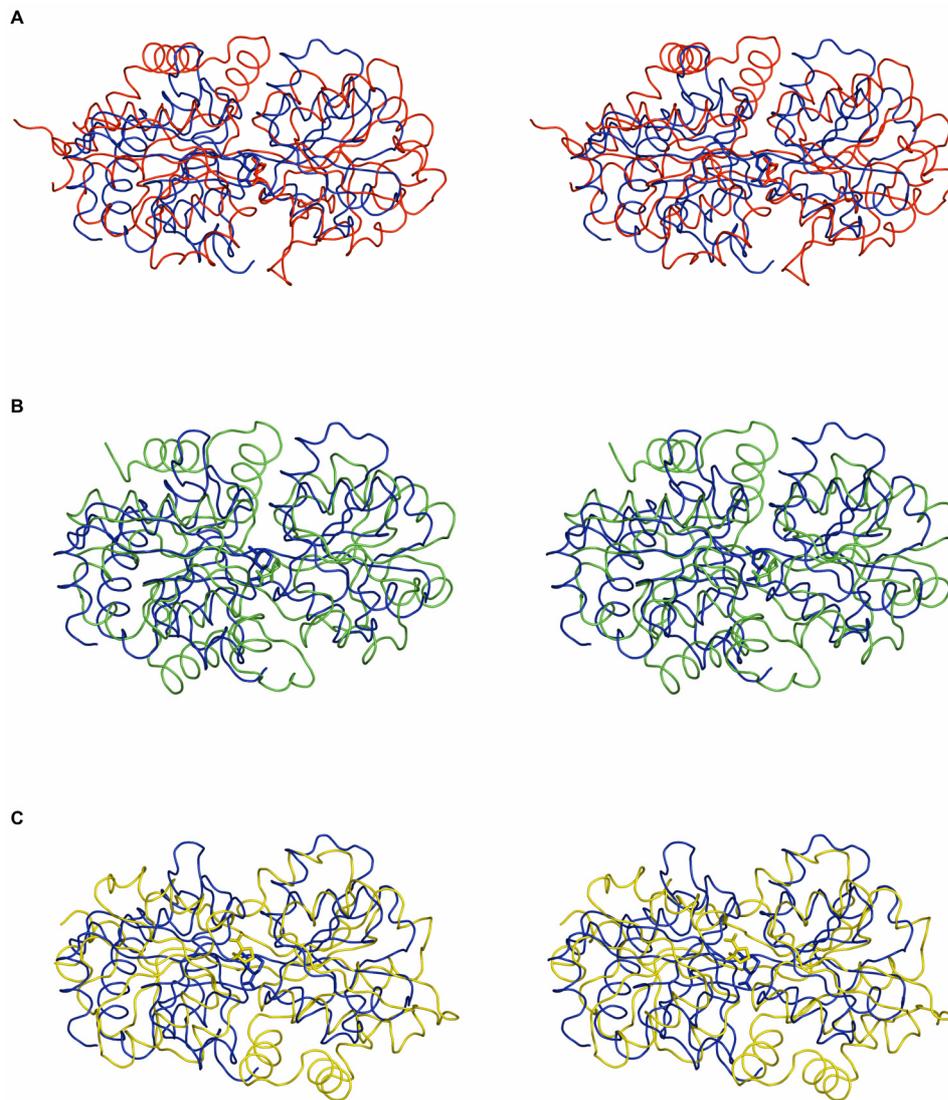


Abb. 4.1: Überlagerung der  $C_{\alpha}$ -Positionen von EhuB aus *S. meliloti* (in blau mit gebundenem Substrat Ection) mit (A) ProX aus *E. coli* (in rot mit gebundenem Substrat Prolin-Betain, Proteindatenbank Zugangscode 1R9Q) (B) ProX aus *A. fulgidus* (in grün mit gebundenem Substrat Prolin-Betain, Proteindatenbank Zugangscode 1SW1) und (C) OpuAC aus *B. subtilis* (in gelb mit gebundenem Substrat Prolin-Betain, Proteindatenbank Zugangscode 2B4M). Die Überlagerung der Strukturen erfolgte mit Hilfe des im Programm LSQMAN implementierten „global superposition-distance-based Needleman-Wunsch“ Algorithmus.

Die in Abb. 4.1A dargestellte Überlagerung der Strukturen von EhuB (in blau) und ProX aus *E. coli* (in rot) zeigt, wie bereits angedeutet, signifikante Abweichungen in der dreidimensionalen Struktur der beiden Proteine. Der durch die Überlagerung erhaltene Struktur-basierende Sequenzvergleich der beiden Proteine (siehe Abb. 4.2A) stellt diese Unterschiede in einer übersichtlichen Form dar. Die Verteilung der insgesamt 134 strukturell äquivalenten bzw. identischen Reste der beiden Proteine zeigt, dass die strukturellen Unterschiede über die gesamten Proteinstrukturen verteilt sind. Die größten Unterschiede finden sich dabei in der Domäne 2 N-terminal der Gelenkregion und am in der Domäne 1 gelegenen C-Terminus der Proteine. Die Grundlage für die Unterschiede in der Region N-terminal der Gelenkregion, die die zentralen  $\beta$ -Faltblätter der Domäne 2 mit der Gelenkregion verbindet, bildet ein aus den Resten 198 bis 228 bestehender Bereich der Polypeptidkette von ProX aus *E. coli*, der in EhuB fehlt.

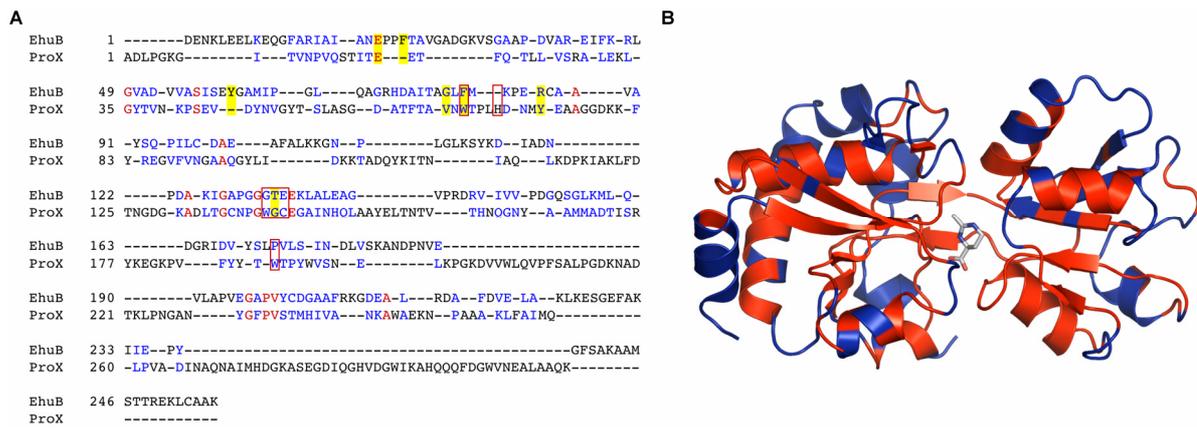


Abb. 4.2: Struktur-basierender Sequenzvergleich von EhuB mit ProX aus *E. coli*. In (A) ist der unter Verwendung von LSQMAN erhaltene Struktur-basierende Sequenzvergleich von EhuB mit ProX aus *E. coli* dargestellt. Die strukturell äquivalenten bzw. identischen Reste sind dabei blau bzw. rot eingefärbt. Weiterhin sind die mit dem Substrat Ectoin interagierenden Reste von EhuB gelb unterlegt, während die mit dem Substrat Prolin-Betain wechselwirkenden Reste von ProX rot eingerahmt sind. In der in (B) gezeigten Darstellung der Struktur von EhuB sind die mit ProX aus *E. coli* strukturell äquivalenten oder identischen Reste rot eingefärbt.

Der Vergleich der C-Termini der beiden Strukturen ergibt ein ähnliches Bild, denn auch dieser Bereich der Proteine ist in ProX aus *E. coli* mit 45 Resten deutlich stärker ausgeprägt als in EhuB mit lediglich 19 Resten. Weiterhin besitzen die vorwiegend aus  $\alpha$ -Helices bestehenden C-Termini der beiden Proteine eine unterschiedliche räumliche Lage der Polypeptidkette. Der Struktur-basierende Sequenzvergleich zeigt weiterhin, dass 5 von 7 bzw. 5 von 6 Resten, die in EhuB bzw. ProX aus *E. coli* mit dem Substrat interagieren, einen strukturell äquivalenten Rest besitzen. Von den beschriebenen Resten sind jedoch lediglich Phe<sup>80</sup> bzw. Trp<sup>65</sup> und Thr<sup>133</sup> bzw. Gly<sup>141</sup> sowohl in EhuB als auch ProX aus *E. coli* an der Wechselwirkung mit dem Substrat beteiligt. In Abb. 4.2B ist eine Darstellung der Struktur von EhuB gezeigt, in der die mit ProX aus *E. coli* strukturell äquivalenten Reste rot eingefärbt sind. Diese Darstellung veranschaulicht, dass die zentralen Strukturelemente – wie die  $\beta$ -Faltblätter der beiden Domänen – zwischen EhuB und ProX aus *E. coli* weitgehend konserviert sind, was der rmsd-Wert von 2,181 Å für die 134 überlagerten C $\alpha$  Atome belegt.

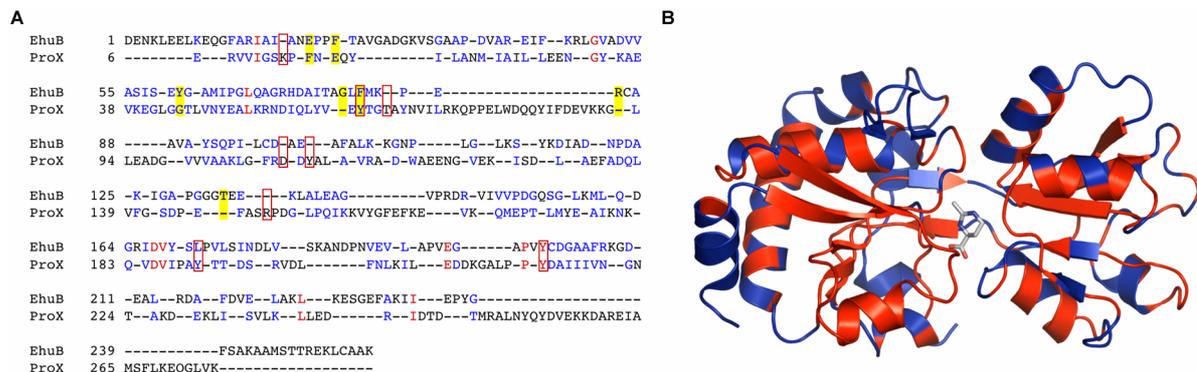


Abb. 4.3: Struktur-basierender Sequenzvergleich von EhuB mit ProX aus *A. fulgidus*. In (A) ist der unter Verwendung von LSQMAN erhaltene Struktur-basierende Sequenzvergleich von EhuB mit ProX aus *A. fulgidus* dargestellt. Die strukturell äquivalenten bzw. identischen Reste sind dabei blau bzw. rot eingefärbt. Weiterhin sind die mit dem Substrat Ectoin interagierenden Reste von EhuB gelb unterlegt, während die mit dem Substrat Prolin-Betain wechselwirkenden Reste von ProX rot eingerahmt sind. In der in (B) gezeigten Darstellung der Struktur von EhuB sind die mit ProX aus *A. fulgidus* strukturell äquivalenten oder identischen Reste rot eingefärbt.

Die strukturellen Unterschiede der beiden Proteine sind im Gegensatz dazu hauptsächlich in der Peripherie der Proteine lokalisiert. Die überlagerten Strukturen von EhuB und ProX aus *E.*

*coli* zeigen weiterhin eine stärkere Konservierung der Struktur von Domäne 1 im Vergleich zu Domäne 2. Der auf Grundlage der Überlagerung der Strukturen von EhuB und ProX aus *A. fulgidus* erhaltene Struktur-basierende Sequenzvergleich, der in Abb. 4.3A gezeigt ist, visualisiert die deutlichen strukturellen Unterschiede der beiden Proteine. Die wesentlichen Unterschiede der beiden Strukturen entstehen dabei, wie im Fall von ProX aus *E. coli*, durch zusätzliche Abschnitte der Polypeptidkette, die nur in ProX aus *A. fulgidus* vorhanden sind. Diese Bereiche umfassen einerseits die in der Domäne 1 von ProX aus *A. fulgidus* gelegenen Reste 73 bis 92 sowie andererseits den C-Terminus des Proteins. Der Struktur-basierende Sequenzvergleich zeigt weiterhin, dass 4 von 7 bzw. 2 von 7 Resten, die in EhuB bzw. ProX aus *A. fulgidus* an der Wechselwirkung mit dem Substrat beteiligt sind, einen strukturell äquivalenten Rest besitzen. Interessanterweise ist jedoch lediglich der Rest Phe<sup>80</sup> bzw. Tyr<sup>63</sup> in beiden Strukturen an der Interaktion mit dem Substrat beteiligt. Die in Abb. 4.3B gezeigte Darstellung der Struktur von EhuB, in der die mit ProX aus *A. fulgidus* strukturell äquivalenten Reste rot hervorgehoben sind, zeigt, dass die zentralen Strukturelemente der Proteine weitgehend übereinstimmen. Der bei der Überlagerung erhaltene rmsd-Wert von 2,081 Å für 137 C<sub>α</sub> Atome zeigt die im Vergleich zu ProX aus *E. coli* größere strukturelle Übereinstimmung von ProX aus *A. fulgidus* und EhuB. Weiterhin ergibt die Überlagerung von EhuB mit ProX aus *A. fulgidus* – wie für den Fall von ProX aus *E. coli* – eine stärkere strukturelle Übereinstimmung in der Domäne 1.

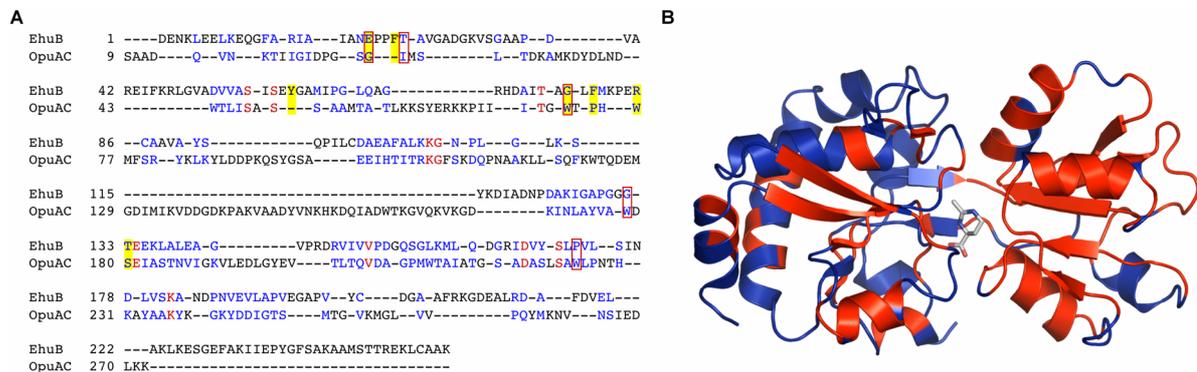


Abb. 4.4: Struktur-basierender Sequenzvergleich von EhuB mit OpuAC aus *B. subtilis*. In (A) ist der unter Verwendung von LSQMAN erhaltene Struktur-basierende Sequenzvergleich von EhuB mit OpuAC dargestellt. Die strukturell äquivalenten bzw. identischen Reste sind dabei blau bzw. rot eingefärbt. Weiterhin sind die mit dem Substrat Ectoin interagierenden Reste von EhuB gelb unterlegt, während die mit dem Substrat Betain wechselwirkenden Reste von OpuAC rot eingerahmt sind. In der in (B) gezeigten Darstellung der Struktur von EhuB sind die mit OpuAC strukturell äquivalenten oder identischen Reste rot eingefärbt.

Der in Abb. 4.4A gezeigte Struktur-basierende Sequenzvergleich von EhuB und OpuAC aus *B. subtilis* zeigt im Vergleich mit den für ProX aus *E. coli* und *A. fulgidus* erhaltenen Ergebnissen größere strukturelle Unterschiede der beiden Proteine. Dieses belegt der für diese Überlagerung erhaltene rmsd-Wert von 2,119 Å für lediglich 122 von 256 C<sub>α</sub> Atomen. Einen wesentlichen Anteil an den strukturellen Unterschieden der beiden Proteine haben einerseits die in der Domäne 2 von OpuAC gelegenen Reste 122 bis 169, die in EhuB fehlen, und andererseits der in der Domäne 1 gelegene C-Terminus von EhuB. Weiterhin besitzen 5 von 7 bzw. 5 von 5 Resten, die in EhuB bzw. OpuAC an der Interaktion mit dem Substrat beteiligt sind, einen strukturell äquivalenten Rest. Von diesen Resten sich jedoch lediglich Glu<sup>21</sup> bzw. Gly<sup>26</sup> und Gly<sup>78</sup> bzw. Trp<sup>72</sup> in beiden Proteinen an der Wechselwirkung mit dem Substrat be-

teilt. Die *Abb. 4.4B* zeigt die Struktur von EhuB in einer Darstellung, in welcher die mit OpuAC strukturell äquivalenten Reste rot eingefärbt sind. Diese Abbildung veranschaulicht, dass die zentralen Strukturelemente der beiden Proteine, wie für den Fall von ProX aus *E. coli* und *A. fulgidus* gezeigt, weitgehend übereinstimmen. Im Gegensatz zu den für die beiden ProX Strukturen erhaltenen Ergebnissen findet sich bei der Überlagerung der Strukturen von EhuB und OpuAC eine größere strukturelle Übereinstimmung der Domäne 2 im Vergleich zu Domäne 1.

Zusammenfassend zeigt der Vergleich von EhuB mit den ebenfalls kompatible Solute bindenden Substratbindeproteinen ProX aus *E. coli* und *A. fulgidus* sowie OpuAC aus *B. subtilis* eine weitgehende strukturelle Übereinstimmung der zentralen Strukturelemente, was für diese Klasse von Proteinen zu erwarten war (Wilkinson und Verschueren, 2003). Die deutlichen strukturellen Unterschiede, die bei der Überlagerung der Proteine beobachtet werden, finden sich hauptsächlich in der Peripherie der Proteine, sowie an der Grenzfläche der beiden Domänen, in der auch die Substratbindungsstelle der Proteine lokalisiert ist. Der Vergleich der an der Interaktion mit den Substraten beteiligten Reste zeigt, dass die genannten Proteine unterschiedliche Abschnitte der Polypeptidkette an der Grenzfläche der Domänen für die Wechselwirkung mit den Substraten nutzen. Eine Ausnahme bildet der Abschnitt der Polypeptidkette, in dem sich die Reste Phe<sup>80</sup>, Trp<sup>65</sup>, Tyr<sup>63</sup> und Trp<sup>72</sup> in EhuB, ProX aus *E. coli*, ProX aus *A. fulgidus* und OpuAC befinden. In diesem Abschnitt der Polypeptidkette befinden sich in allen untersuchten Proteinen aromatische Reste, die an der Interaktion mit dem Substrat beteiligt sind. Die Reste Phe<sup>80</sup>, Trp<sup>65</sup> und Tyr<sup>63</sup> aus EhuB, ProX aus *E. coli* und ProX aus *A. fulgidus* sind dabei strukturell äquivalent, während der Rest Trp<sup>72</sup> aus OpuAC strukturell äquivalent zum N-terminal von Phe<sup>80</sup> gelegenen Rest Gly<sup>78</sup> in EhuB ist.

#### 4.2.3 Molekulare Grundlagen der Bindung von kompatiblen Soluten

Der Vergleich der in *Abb. 4.5A-D* gezeigten Substratbindungsstellen der kompatible Solute bindenden Substratbindeproteine EhuB aus *S. meliloti* (**A**), ProX aus *E. coli* (**B**), ProX aus *A. fulgidus* (**C**) und OpuAC aus *B. subtilis* (**D**) zeigt trotz der in Kapitel 4.2.2 diskutierten strukturellen Unterschiede dieser Proteine die gleichen Prinzipien zur Bindung ihrer Substrate. Die Bindung der negativ geladenen Carboxylat-Gruppe der Substrate basiert dabei auf der Bildung von Salzbrücken und/oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Protein und dem jeweiligen Substrat. Im Unterschied dazu erfolgt die Wechselwirkung des Proteins mit dem kationischen Anteil des Substrats vorwiegend mit bestimmten aromatischen Resten, die durch ihre räumliche Anordnung eine optimale Bindungsstelle für die delokalisierte positive Ladung der Substrate bilden. Der wesentliche Beitrag dieser wahrscheinlich auf Kation- $\pi$  und van der Waals Interaktionen beruhenden Wechselwirkung an der Substratbindung wurde für EhuB ((Hanekop et al., Manuskript in Vorbereitung); *Tab. 4.1* & *Tab. 4.2*) und ProX aus *E. coli* ((Schiefner et al., 2004a); *Tab. 4.3*) durch Punktmutationen in Verbindung mit einer Bestimmung der Dissoziationskonstanten gezeigt.

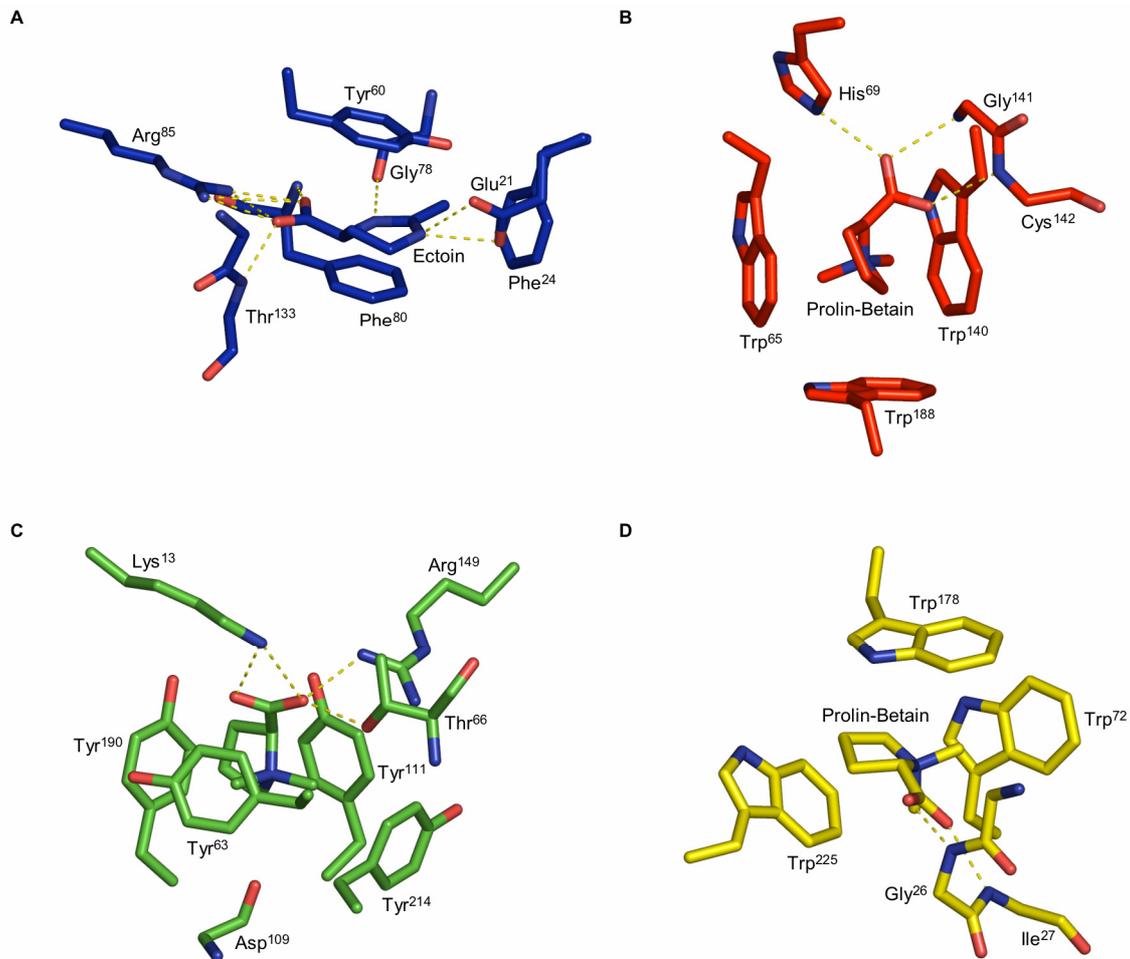


Abb. 4.5: Die Interaktionen zwischen ausgewählten Substratbindeproteinen und ihren Substraten. Dargestellt sind (A) die Wechselwirkungen zwischen EhuB und seinem Substrat Ectoin. Weiterhin sind die Interaktionen von (B) ProX aus *E. coli* (1R9Q), (C) ProX aus *A. fulgidus* (1SW1) und (D) OpuAC aus *B. subtilis* mit ihrem Substrat Prolin-Betain gezeigt. Zur besseren Übersicht sind jeweils nur die mit dem Substrat interagierenden Teile der entsprechenden Reste gezeigt. Die in den Proteinen identifizierten Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien angedeutet.

Diese Untersuchungen zeigten übereinstimmend die zentrale Bedeutung eines bestimmten aromatischen Restes (Phe<sup>80</sup> in EhuB bzw. Trp<sup>188</sup> in ProX aus *E. coli*), sowie mindestens eines weiteren aromatischen Restes für die Substratbindung.

| Punktmutation zu Aminosäure | Trp <sup>65</sup> |        | Trp <sup>140</sup> |        | Trp <sup>188</sup> |        |
|-----------------------------|-------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|
|                             | K <sub>D</sub>    | S.D.   | K <sub>D</sub>     | S.D.   | K <sub>D</sub>     | S.D.   |
| Wildtyp                     | 4 µM              | 0,1 µM | 4 µM               | 0,1 µM | 4 µM               | 0,1 µM |
| Phe                         | 4 µM              | 0,1 µM | 3 µM               | 0,3 µM | 4 µM               | 0,4 µM |
| Tyr                         | 13 µM             | 0,6 µM | 4 µM               | 0,5 µM | 5 µM               | 0,2 µM |
| Ala                         | 50 µM             | 3,3 µM | 56 µM              | 10 µM  | –                  | –      |
| Leu                         | –                 | –      | 14 µM              | 1,4 µM | –                  | –      |
| Asp                         | –                 | –      | 8 µM               | 0,8 µM | –                  | –      |
| Glu                         | –                 | –      | 21 µM              | 2,5 µM | –                  | –      |
| Trp <sup>65</sup> →Ala      | –                 | –      | –                  | –      | –                  | –      |
| Trp <sup>140</sup> →Ala     | –                 | –      | –                  | –      | –                  | –      |

Tab. 4.3: Dissoziationskonstanten von unterschiedlichen ProX Konstrukten für ihr Substrat Glycin-Betain und ihre Standardabweichungen (entnommen aus: (Schiefner et al., 2004a)). Die verwendeten Symbole und Abkürzungen bedeuten:

– : keine Bindung bis zu einer Substratkonzentration von 110 µM

S.D. : Standardabweichung (engl. standard deviation)

Im Unterschied zu ProX aus *E. coli* ergab die Untersuchung von EhuB ferner einen Einfluss der aromatischen Reste auf die Stärke ihrer Wechselwirkung mit dem kationischen Anteil des Substrats. Ein weiteres Ergebnis der mit den beiden Proteinen durchgeführten Experimente war, dass die von den aromatischen Resten ausgehenden Wechselwirkungen teilweise durch negativ geladene Reste ersetzt werden konnten. Der Austausch eines aromatischen Restes durch einen sauren Rest hatte dabei im Fall von EhuB im Vergleich zu ProX aus *E. coli* deutlich seltener den Verlust der Substratbindung zur Folge, sowie generell moderatere Auswirkungen auf die Bindungsaffinität des Proteins. Der Grund hierfür könnte die Stabilisierung des kationischen Anteils des Substrats durch die Bildung zweier Salzbrücken sowie einer Wasserstoffbrückenbindung in EhuB sein.

Die detaillierte Analyse der Bindungsstellen der untersuchten Proteine für den kationischen Anteil der Substrate zeigt jedoch, trotz der gleichen Prinzipien zur Bindung ihrer Substrate, deutliche Unterschiede in der Art, Zahl und Anordnung der aromatischen Reste, die diese Bindungsstelle bilden. In EhuB beispielsweise werden zur Wechselwirkung mit dem Substrat die aromatischen Reste Phenylalanin und Tyrosin verwendet. Im Unterschied dazu erfolgt die Interaktion in ProX aus *A. fulgidus* mit Hilfe von Tyrosin-Resten, während in ProX aus *E. coli* und OpuAC zu diesem Zweck Tryptophan-Reste verwendet werden. Weiterhin unterscheiden sich die Bindungsstellen der untersuchten Proteine in der Zahl der an der Interaktion mit dem kationischen Anteil der Substrate beteiligten aromatischen Reste: in EhuB, ProX aus *E. coli* und OpuAC sind drei und in ProX aus *A. fulgidus* vier aromatische Reste an dieser Interaktion beteiligt. Die Substratbindungsstellen von EhuB und ProX aus *A. fulgidus* zeigen weiterhin, dass noch weitere Wechselwirkungen an der Bindung des kationischen Anteils der Substrate beteiligt sein können.

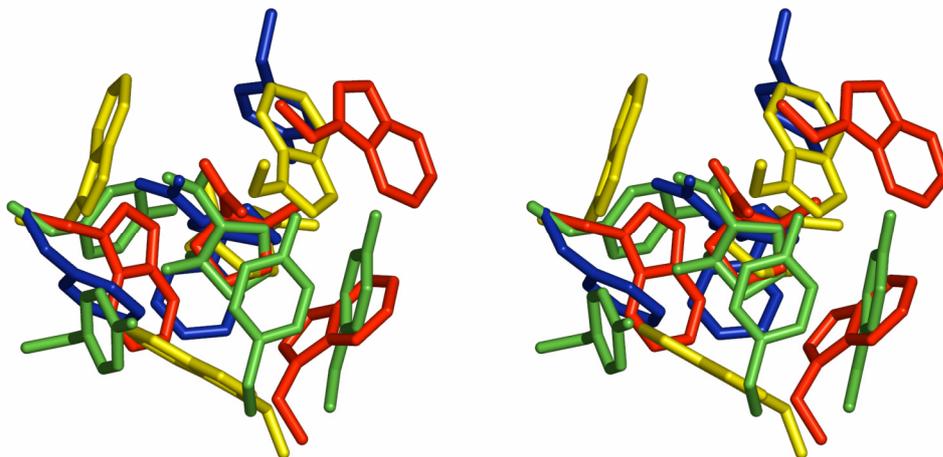


Abb. 4.6: Die Substrate und die mit ihnen interagierenden aromatischen Reste ausgewählter Substratbindeproteine. Die Stereoabbildung zeigt die Substrate Ectoïn (in blau) und Prolin-Betain (in rot, grün und gelb) sowie die mit ihnen wechselwirkenden aromatischen Reste von EhuB aus *S. meliloti* (in blau), ProX aus *E. coli* (in rot), ProX aus *A. fulgidus* (in grün) und OpuAC aus *B. subtilis* (in gelb). Die Strukturen wurden mit Hilfe des im Programm LSQMAN implementierten „global superposition-distance-based Needleman-Wunsch alignment“ überlagert. Im Interesse einer übersichtlichen Darstellung sind lediglich die relevanten Teile der Seitenketten der aromatischen Reste dargestellt.

Zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Art, Zahl und Anordnung der mit dem Substrat interagierenden aromatischen Reste sind in Abb. 4.6 die mit dem Substrat wechselwirkenden aromatischen Reste von EhuB aus *S. meliloti* (in blau), ProX aus *E. coli* (in rot), ProX aus *A.*

*fulgidus* (in grün) und OpuAC aus *B. subtilis* (in gelb) sowie die von ihnen gebundenen Substrate Ectoin (in blau) und Prolin-Betain (in rot, grün und gelb) dargestellt. Die in den untersuchten Proteinen beobachtete unterschiedliche Art, Zahl und Anordnung der aromatischen Reste, die die Bindungsstelle für den kationischen Anteil der Substrate bilden, könnte dabei eine Anpassung an die für ihre Aufgabe benötigte Bindungsaffinität und das zu bindende Substrat darstellen. Hierfür spricht unter anderem, die im Vergleich zu den anderen untersuchten Proteinen ( $K_D \sim \mu\text{M}$ ) deutlich höhere Bindungsaffinität von ProX aus *A. fulgidus* ( $K_D=50 \text{ nM}$  für Prolin-Betain), das aus einem hyperthermophilen Organismus stammt und zur effektiven Bindung seiner Substrate bei höheren Temperaturen eine größere Affinität benötigt.

Insgesamt zeigt der Vergleich der Substratbindungsstellen der für kompatible Solute spezifischen Substratbindeproteine EhuB aus *S. meliloti*, ProX aus *E. coli*, ProX aus *A. fulgidus* und OpuAC aus *B. subtilis* gemeinsame Prinzipien zur Bindung dieser Klasse von Substraten, die jedoch in jedem einzelnen Fall an die für die Funktion benötigte Bindungsaffinität und das Substrat angepasst zu sein scheinen.

#### 4.2.4 Ausblick

Die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Substratspezifität des ABC-Importers Ehu aus *S. meliloti* im Rahmen dieser Arbeit ist, wie schon eingangs der Diskussion angedeutet, lediglich der erste Schritt, um die Aufnahme von kompatiblen Soluten auf molekularer Ebene zu verstehen. Der nächste Schritt nach der erfolgreichen Strukturbestimmung des Substratbindeproteins EhuB im Komplex mit den kompatiblen Soluten Ectoin und Hydroxyectoin sollte einerseits die strukturelle Untersuchung der weiteren Komponenten dieses ABC-Transporters sowie andererseits die Analyse ihrer Wechselwirkungen miteinander sein. Für eine strukturelle Charakterisierung sind die integralen Membranproteine EhuC und EhuD von besonderem Interesse, da sie den Weg zur Translokation der Substrate bilden. Die Stimulation der ATPase-Aktivität des Substratbindeprotein-abhängigen Maltose-Transporters aus *E. coli* durch sein Substrat-beladenes Bindeprotein (Davidson et al., 1992) verdeutlicht, dass die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten des Transporters mindestens ebenso wichtig für das Verständnis des Transportprozesses ist, wie die Charakterisierung seiner Bestandteile. Zur strukturellen Untersuchung der Interaktionen zwischen den einzelnen Komponenten bieten sich die Zustände des Transportzyklus an, in denen die einzelnen Bestandteile des Transporters im Komplex miteinander vorliegen. Für den Maltose-Transporter aus *E. coli* konnte ein solcher Komplex aus dem Substratbindeprotein, den integralen Membranproteinen und den NBDs durch die Inhibierung letzterer mit Vanadat stabil isoliert werden (Chen et al., 2001).

## 5 Literatur

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. und Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**, 621-628.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R. und Iwata, S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*, **301**, 610-615.
- Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V. und Dean, M. (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res*, **58**, 5337-5339.
- Altenberg, G.A., Vanoye, C.G., Horton, J.K. und Reuss, L. (1994) Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4654-4657.
- Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I. und Gottesman, M.M. (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 361-398.
- Ames, G.F., Mimura, C.S. und Shyamala, V. (1990) Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: Traffic ATPases. *FEMS Microbiol Rev*, **6**, 429-446.
- Barlow, D.J. und Thornton, J.M. (1983) Ion-pairs in proteins. *J Mol Biol*, **168**, 867-885.
- Baykov, A.A., Evtushenko, O.A. und Avaeva, S.M. (1988) A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem*, **171**, 266-270.
- Bianchet, M.A., Ko, Y.H., Amzel, L.M. und Pedersen, P.L. (1997) Modeling of nucleotide binding domains of ABC transporter proteins based on a F<sub>1</sub>-ATPase/recA topology: structural model of the nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Bioenerg Biomembr*, **29**, 503-524.
- Bishop, L., Agbayani, R., Jr., Ambudkar, S.V., Maloney, P.C. und Ames, G.F. (1989) Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 6953-6957.
- Bjorkman, A.J. und Mowbray, S.L. (1998) Multiple open forms of ribose-binding protein trace the path of its conformational change. *J Mol Biol*, **279**, 651-664.
- Blow, D. (2002) *Outline of crystallography for biologists*. Oxford University Press, Oxford.
- Bolhuis, H., Molenaar, D., Poelarends, G., van Veen, H.W., Poolman, B., Driessen, A.J. und Konings, W.N. (1994) Proton motive force-driven and ATP-dependent drug extrusion systems in multidrug-resistant *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, **176**, 6957-6964.
- Bolhuis, H., van Veen, H.W., Molenaar, D., Poolman, B., Driessen, A.J. und Konings, W.N. (1996) Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *Embo J*, **15**, 4239-4245.
- Boos, W. und Lucht, J.M. (1996) Periplasmic binding protein-dependent ABC transporters. In Neidhard, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. und Umberger, H.E. (eds.), *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., pp. 1175-1209.

- Borths, E.L., Locher, K.P., Lee, A.T. und Rees, D.C. (2002) The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16642-16647.
- 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**, 248-254.
- Brünger, A.T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**, 472-475.
- Brünger, A.T. (1993) Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **49**, 24-36.
- Chang, G. (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol*, **330**, 419-430.
- Chang, G. und Roth, C.B. (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*, **293**, 1793-1800.
- Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A.L. und Quijoch, F.A. (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell*, **12**, 651-661.
- Chen, J., Sharma, S., Quijoch, F.A. und Davidson, A.L. (2001) Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1525-1530.
- Clarke, T.E., Ku, S.Y., Dougan, D.R., Vogel, H.J. und Tari, L.W. (2000) The structure of the ferric siderophore binding protein FhuD complexed with gallichrome. *Nat Struct Biol*, **7**, 287-291.
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M. und Deeley, R.G. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, **258**, 1650-1654.
- Csonka, L.N. und Epstein, W. (1996) Osmoregulation. In Neidhard, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. und Umberger, H.E. (eds.), *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., pp. 1210-1223.
- Dahout-Gonzalez, C., Brandolin, G. und Pebay-Peyroula, E. (2003) Crystallization of the bovine ADP/ATP carrier is critically dependent upon the detergent-to-protein ratio. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**, 2353-2355.
- Davidson, A.L. und Chen, J. (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem*, **73**, 241-268.
- Davidson, A.L., Shuman, H.A. und Nikaido, H. (1992) Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 2360-2364.
- de Ruyter, P.G., Kuipers, O.P. und de Vos, W.M. (1996) Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 3662-3667.
- Dean, M. und Allikmets, R. (2001) Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr*, **33**, 475-479.
- Diederichs, K., Diez, J., Greller, G., Müller, C., Breed, J., Schnell, C., Vornrhein, C., Boos, W. und Welte, W. (2000) Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *Embo J*, **19**, 5951-5961.

- Dougherty, D.A. (1996) Cation- $\pi$  interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science*, **271**, 163-168.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K. und Ross, D.D. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15665-15670.
- Drenth, J. (1999) *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer-Verlag, New York.
- Endicott, J.A. und Ling, V. (1989) The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem*, **58**, 137-171.
- Engel, C.K., Chen, L. und Prive, G.G. (2002) Stability of the lactose permease in detergent solutions. *Biochim Biophys Acta*, **1564**, 47-56.
- Fling, S.P. und Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem*, **155**, 83-88.
- Ford, J.M. und Hait, W.N. (1990) Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev*, **42**, 155-199.
- Garavito, R.M., Picot, D. und Loll, P.J. (1996) Strategies for crystallizing membrane proteins. *J Bioenerg Biomembr*, **28**, 13-27.
- Gaudet, R. und Wiley, D.C. (2001) Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J*, **20**, 4964-4972.
- Germann, U.A. (1996) P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer*, **32A**, 927-944.
- Gilson, E., Alloing, G., Schmidt, T., Claverys, J.P., Dudler, R. und Hofnung, M. (1988) Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in Mycoplasma. *Embo J*, **7**, 3971-3974.
- Gottesman, M.M. und Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*, **62**, 385-427.
- Gouffi, K. und Blanco, C. (2000) Is the accumulation of osmoprotectant the unique mechanism involved in bacterial osmoprotection? *Int J Food Microbiol*, **55**, 171-174.
- Hanekop, N., Höing, M., Sohn-Bösser, L., Jebbar, M., Schmitt, L. und Bremer, E. (Manuskript in Vorbereitung) Crystal structure of the ligand-binding protein EhuB from *Sinorhizobium meliloti* reveals substrate recognition of the compatible solutes ectoine and hydroxyectoine.
- Hanekop, N., Zaitseva, J., Jenewein, S., Holland, I.B. und Schmitt, L. (2006) Molecular insights into the mechanism of ATP-hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB. *FEBS Lett*, **580**, 1036-1041.
- Hanrahan, J.W., Gentsch, M. und Riordan, J.R. (2003) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7). In Holland, I.B., Cole, S.P., Kuchler, K. und Higgins, C.F. (eds.), *ABC proteins from bacteria to man*. Academic Press, Amsterdam.
- Hendrickson, W.A., Horton, J.R. und LeMaster, D.M. (1990) Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *Embo J*, **9**, 1665-1672.
- Hendrickson, W.A., Smith, J.L., Phizackerley, R.P. und Merritt, E.A. (1988) Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation. *Proteins*, **4**, 77-88.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, **8**, 67-113.

- Higgins, C.F. und Gottesman, M.M. (1992) Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci*, **17**, 18-21.
- Higgins, C.F., Haag, P.D., Nikaido, K., Ardeshir, F., Garcia, G. und Ames, G.F. (1982) Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature*, **298**, 723-727.
- Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P., Gill, D.R., Downie, J.A., Evans, I.J., Holland, I.B., Gray, L., Buckel, S.D., Bell, A.W. und et al. (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*, **323**, 448-450.
- Higgins, C.F., Hiles, I.D., Whalley, K. und Jamieson, D.J. (1985) Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding protein-dependent transport systems. *Embo J*, **4**, 1033-1039.
- Higgins, C.F. und Linton, K.J. (2003) ABC transporters: an introduction and overview. In Holland, I.B., Cole, S.P., Kuchler, K. und Higgins, C.F. (eds.), *ABC proteins from bacteria to man*. Academic Press, Amsterdam.
- Hobson, A.C., Weatherwax, R. und Ames, G.F. (1984) ATP-binding sites in the membrane components of histidine permease, a periplasmic transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 7333-7337.
- Höing, M. (2005) Gerichtete Mutagenese des Ectoin/Hydroxyectoin-Bindeproteins EhuB aus *Sinorhizobium meliloti*. *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität, Marburg/Lahn.
- Holland, I.B. und Blight, M.A. (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol*, **293**, 381-399.
- Holland, I.B., Schmitt, L. und Young, J. (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol*, **22**, 29-39.
- Homolya, L., Hollo, Z., Germann, U.A., Pastan, I., Gottesman, M.M. und Sarkadi, B. (1993) Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *J Biol Chem*, **268**, 21493-21496.
- Horn, C., Sohn-Bosser, L., Breed, J., Welte, W., Schmitt, L. und Bremer, E. (2006) Molecular Determinants for Substrate Specificity of the Ligand-binding Protein OpuAC from *Bacillus subtilis* for the Compatible Solutes Glycine Betaine and Proline Betaine. *J Mol Biol*.
- Hsiao, C.D., Sun, Y.J., Rose, J. und Wang, B.C. (1996) The crystal structure of glutamine-binding protein from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **262**, 225-242.
- Huang, Y., Lemieux, M.J., Song, J., Auer, M. und Wang, D.N. (2003) Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*, **301**, 616-620.
- Huber, R. (1965) Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Crystallogr*, **19**, 353-356.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F. und Kim, S.H. (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, **396**, 703-707.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmann, T. und Michel, H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure*, **8**, 669-684.
- Hunte, C. und Michel, H. (2002) Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 503-508.
- Inbar, L., Frolov, F. und Lapidot, A. (1993) The conformation of new tetrahydropyrimidine derivatives in solution and in the crystal. *Eur J Biochem*, **214**, 897-906.

- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. und Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, **376**, 660-669.
- Jancarik, J. und Kim, S.-H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.
- Jebbar, M., Sohn-Bosser, L., Bremer, E., Bernard, T. und Blanco, C. (2005) Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an Ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J Bacteriol*, **187**, 1293-1304.
- Jeffrey, G.A. (1997) *An introduction to hydrogen bonding*. Oxford University Press, Oxford.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T. und MacKinnon, R. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature*, **423**, 33-41.
- Jones, P.M. und George, A.M. (2004) The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 682-699.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. und Kjeldgaard. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, **47 (Pt 2)**, 110-119.
- Juliano, R.L. und Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, **455**, 152-162.
- Karpowich, N., Martsinkevich, O., Millen, L., Yuan, Y.R., Dai, P.L., MacVey, K., Thomas, P.J. und Hunt, J.F. (2001) Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure*, **9**, 571-586.
- Karpowich, N.K., Huang, H.H., Smith, P.C. und Hunt, J.F. (2003) Crystal structures of the BtuF periplasmic-binding protein for vitamin B12 suggest a functionally important reduction in protein mobility upon ligand binding. *J Biol Chem*, **278**, 8429-8434.
- kein Autor. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **50**, 760-763.
- Kempf, B. und Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol*, **170**, 319-330.
- Kleywegt, G.J. (1999) Experimental assessment of differences between related protein crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**, 1878-1884.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, **305**, 567-580.
- Kumar, S. und Nussinov, R. (1999) Salt bridge stability in monomeric proteins. *J Mol Biol*, **293**, 1241-1255.
- Kunji, E.R., Slotboom, D.J. und Poolman, B. (2003) *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1610**, 97-108.
- Kurusu, G., Zhang, H., Smith, J.L. und Cramer, W.A. (2003) Structure of the cytochrome b<sub>6</sub>f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science*, **302**, 1009-1014.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamzin, V.S. und Wilson, K.S. (1993) Automated refinement of protein models. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **49**, 129-147.
- Lancaster, C.R., Kroger, A., Auer, M. und Michel, H. (1999) Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature*, **402**, 377-385.

- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. und Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.
- Lawrence, M.C., Pilling, P.A., Epa, V.C., Berry, A.M., Ogunniyi, A.D. und Paton, J.C. (1998) The crystal structure of pneumococcal surface antigen PsaA reveals a metal-binding site and a novel structure for a putative ABC-type binding protein. *Structure*, **6**, 1553-1561.
- Lemieux, M.J., Reithmeier, R.A. und Wang, D.N. (2002) Importance of detergent and phospholipid in the crystallization of the human erythrocyte anion-exchanger membrane domain. *J Struct Biol*, **137**, 322-332.
- Lemieux, M.J., Song, J., Kim, M.J., Huang, Y., Villa, A., Auer, M., Li, X.D. und Wang, D.N. (2003) Three-dimensional crystallization of the *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily. *Protein Sci*, **12**, 2748-2756.
- Lewis, H.A., Buchanan, S.G., Burley, S.K., Conners, K., Dickey, M., Dorwart, M., Fowler, R., Gao, X., Guggino, W.B., Hendrickson, W.A., Hunt, J.F., Kearins, M.C., Lorimer, D., Maloney, P.C., Post, K.W., Rajashankar, K.R., Rutter, M.E., Sauder, J.M., Shriver, S., Thibodeau, P.H., Thomas, P.J., Zhang, M., Zhao, X. und Emtage, S. (2004) Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Embo J*, **23**, 282-293.
- Li, A.J. und Nussinov, R. (1998) A set of van der Waals and coulombic radii of protein atoms for molecular and solvent-accessible surface calculation, packing evaluation, and docking. *Proteins*, **32**, 111-127.
- Li, X.D., Villa, A., Gownley, C., Kim, M.J., Song, J., Auer, M. und Wang, D.N. (2001) Monomeric state and ligand binding of recombinant GABA transporter from *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, **494**, 165-169.
- Locher, K.P., Lee, A.T. und Rees, D.C. (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**, 1091-1098.
- Long, S.B., Campbell, E.B. und Mackinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science*, **309**, 897-903.
- Lubelski, J., Mazurkiewicz, P., van Merkerk, R., Konings, W.N. und Driessen, A.J. (2004) ydaG and ydbA of *Lactococcus lactis* encode a heterodimeric ATP-binding cassette-type multidrug transporter. *J Biol Chem*, **279**, 34449-34455.
- Lucht, J.M. und Bremer, E. (1994) Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system proU. *FEMS Microbiol Rev*, **14**, 3-20.
- Mao, B., Pear, M.R., McCammon, J.A. und Quioco, F.A. (1982) Hinge-bending in L-arabinose-binding protein. The "Venus's-flytrap" model. *J Biol Chem*, **257**, 1131-1133.
- Margolles, A., Putman, M., van Veen, H.W. und Konings, W.N. (1999) The purified and functionally reconstituted multidrug transporter LmrA of *Lactococcus lactis* mediates the transbilayer movement of specific fluorescent phospholipids. *Biochemistry*, **38**, 16298-16306.
- Matsuo, M., Ueda, K., Ryder, T. und Ashcroft, F. (2003) The sulfonylurea receptor: an ABCC transporter that acts as an ion channel regulator. In Holland, I.B., Cole, S.P., Kuchler, K. und Higgins, C.F. (eds.), *ABC proteins from bacteria to man*. Academic Press, Amsterdam.
- McPherson, A. (1999) *Crystallization of biological macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

- Michel, H. (1991) General and practical aspects of membrane protein crystallization. In Michel, H. (ed.), *Crystallization of membrane proteins*. CRC Press, Boca Raton, pp. 73-88.
- Mimmack, M.L., Gallagher, M.P., Pearce, S.R., Hyde, S.C., Booth, I.R. und Higgins, C.F. (1989) Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: stoichiometry of ATP hydrolysis during transport in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8257-8261.
- Mourez, M., Hofnung, M. und Dassa, E. (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *Embo J*, **16**, 3066-3077.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. und Dodson, E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **53**, 240-255.
- Murthy, H.M., Hendrickson, W.A., Orme-Johnson, W.H., Merritt, E.A. und Phizackerley, R.P. (1988) Crystal structure of *Clostridium acidi-urici* ferredoxin at 5-Å resolution based on measurements of anomalous X-ray scattering at multiple wavelengths. *J Biol Chem*, **263**, 18430-18436.
- Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr A*, **50**, 157-163.
- Nussberger, S., Dorr, K., Wang, D.N. und Kuhlbrandt, W. (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J Mol Biol*, **234**, 347-356.
- Ostermeier, C., Iwata, S., Ludwig, B. und Michel, H. (1995) Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase. *Nat Struct Biol*, **2**, 842-846.
- Ostermeier, C. und Michel, H. (1997) Crystallization of membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 697-701.
- Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In Carter, C.W. und Sweet, R.M. (eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, Vol. 276.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G.J. und Brandolin, G. (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature*, **426**, 39-44.
- Putman, M., van Veen, H.W. und Konings, W.N. (2000) Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 672-693.
- Raviv, Y., Pollard, H.B., Bruggemann, E.P., Pastan, I. und Gottesman, M.M. (1990) Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J Biol Chem*, **265**, 3975-3980.
- Reyes, C.L. und Chang, G. (2005) Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP.vanadate and lipopolysaccharide. *Science*, **308**, 1028-1031.
- Romsicki, Y. und Sharom, F.J. (2001) Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry*, **40**, 6937-6947.
- Rosenberg, M.F., Callaghan, R., Ford, R.C. und Higgins, C.F. (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem*, **272**, 10685-10694.
- Rosenberg, M.F., Callaghan, R., Modok, S., Higgins, C.F. und Ford, R.C. (2005) Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J Biol Chem*, **280**, 2857-2862.

- Rosenberg, M.F., Kamis, A.B., Callaghan, R., Higgins, C.F. und Ford, R.C. (2003) Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J Biol Chem*, **278**, 8294-8299.
- Rosenberg, M.F., Velarde, G., Ford, R.C., Martin, C., Berridge, G., Kerr, I.D., Callaghan, R., Schmidlin, A., Wooding, C., Linton, K.J. und Higgins, C.F. (2001) Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *Embo J*, **20**, 5615-5625.
- Sauna, Z.E., Smith, M.M., Müller, M., Kerr, K.M. und Ambudkar, S.V. (2001) The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein. *J Bioenerg Biomembr*, **33**, 481-491.
- Saurin, W., Hofnung, M. und Dassa, E. (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol*, **48**, 22-41.
- Schiefner, A., Breed, J., Bosser, L., Kneip, S., Gade, J., Holtmann, G., Diederichs, K., Welte, W. und Bremer, E. (2004a) Cation-pi interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **279**, 5588-5596.
- Schiefner, A., Holtmann, G., Diederichs, K., Welte, W. und Bremer, E. (2004b) Structural basis for the binding of compatible solutes by ProX from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem*, **279**, 48270-48281.
- Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M.A., Holland, I.B. und Stubbs, M.T. (2003) Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol*, **330**, 333-342.
- Schmitt, L. und Tampe, R. (2000) Affinity, specificity, diversity: a challenge for the ABC transporter TAP in cellular immunity. *Chembiochem*, **1**, 16-35.
- Schuttelkopf, A.W. und van Aalten, D.M. (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 1355-1363.
- Seddon, A.M., Curnow, P. und Booth, P.J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, **1666**, 105-117.
- Senior, A.E., al-Shawi, M.K. und Urbatsch, I.L. (1995a) ATP hydrolysis by multidrug-resistance protein from Chinese hamster ovary cells. *J Bioenerg Biomembr*, **27**, 31-36.
- Senior, A.E., al-Shawi, M.K. und Urbatsch, I.L. (1995b) The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett*, **377**, 285-289.
- Shapiro, A.B. und Ling, V. (1997) Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *Eur J Biochem*, **250**, 122-129.
- Shapiro, A.B. und Ling, V. (1998) Transport of LDS-751 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by the rhodamine-123-selective site of P-glycoprotein. *Eur J Biochem*, **254**, 181-188.
- Sharff, A.J., Rodseth, L.E., Spurlino, J.C. und Quioco, F.A. (1992) Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry*, **31**, 10657-10663.
- Sharom, F.J. (1997) The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J Membr Biol*, **160**, 161-175.

- Sharom, F.J., Liu, R., Romsicki, Y. und Lu, P. (1999) Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies. *Biochim Biophys Acta*, **1461**, 327-345.
- Singer, S.J. und Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J. und Hunt, J.F. (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell*, **10**, 139-149.
- Terwilliger, T.C. (2000) Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56 (Pt 8)**, 965-972.
- Terwilliger, T.C. (2003) Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**, 38-44.
- Terwilliger, T.C. und Berendzen, J. (1999) Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55 (Pt 4)**, 849-861.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. und Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, **405**, 647-655.
- van den Berg van Saparoea, H.B., Lubelski, J., van Merkerk, R., Mazurkiewicz, P.S. und Driessen, A.J. (2005) Proton Motive Force-Dependent Hoechst 33342 Transport by the ABC Transporter LmrA of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*, **44**, 16931-16938.
- van der Does, C. und Tampe, R. (2004) How do ABC transporters drive transport? *Biol Chem*, **385**, 927-933.
- van der Heide, T. und Poolman, B. (2000) Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7102-7106.
- van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P. und van Meer, G. (1996) MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*, **87**, 507-517.
- van Veen, H.W., Callaghan, R., Soceneantu, L., Sardini, A., Konings, W.N. und Higgins, C.F. (1998) A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature*, **391**, 291-295.
- van Veen, H.W., Margolles, A., Muller, M., Higgins, C.F. und Konings, W.N. (2000) The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *Embo J*, **19**, 2503-2514.
- van Veen, H.W., Venema, K., Bolhuis, H., Oussenko, I., Kok, J., Poolman, B., Driessen, A.J. und Konings, W.N. (1996) Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10668-10672.
- Verdon, G., Albers, S.V., Dijkstra, B.W., Driessen, A.J. und Thunnissen, A.M. (2003a) Crystal structures of the ATPase subunit of the glucose ABC transporter from *Sulfolobus solfataricus*: nucleotide-free and nucleotide-bound conformations. *J Mol Biol*, **330**, 343-358.
- Verdon, G., Albers, S.V., van Oosterwijk, N., Dijkstra, B.W., Driessen, A.J. und Thunnissen, A.M. (2003b) Formation of the productive ATP-Mg<sup>2+</sup>-bound dimer of GlcV, an ABC-ATPase from *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol*, **334**, 255-267.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. und Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J*, **1**, 945-951.

- Wallin, E. und von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, **7**, 1029-1038.
- Wilkinson, A.J. und Verschuere, K.H.G. (2003) Crystal structures of periplasmic solute-binding proteins in ABC transport complexes illuminate their function. In Holland, I.B., Cole, S.P., Kuchler, K. und Higgins, C.F. (eds.), *ABC proteins from bacteria to man*. Academic Press, Amsterdam.
- Winn, M.D., Isupov, M.N. und Murshudov, G.N. (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 122-133.
- Woolfson, M.M. (1997) *An introduction to X-ray crystallography*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Yao, N., Trakhanov, S. und Quioco, F.A. (1994) Refined 1.89-Å structure of the histidine-binding protein complexed with histidine and its relationship with many other active transport/chemosensory proteins. *Biochemistry*, **33**, 4769-4779.
- Yu, C.A., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Yu, L., Xia, D., Kim, H. und Deisenhofer, J. (1996) Crystallization and preliminary structure of beef heart mitochondrial cytochrome-bc<sub>1</sub> complex. *Biochim Biophys Acta*, **1275**, 47-53.
- Yuan, Y.R., Blecker, S., Martsinkevich, O., Millen, L., Thomas, P.J. und Hunt, J.F. (2001) The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J. Biol. Chem.*, **276**, 32313-32321.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I.B. und Schmitt, L. (2005a) H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Embo J*, **24**, 1901-1910.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Oswald, C., Jumpertz, T., Holland, I.B. und Schmitt, L. (2005b) A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Biochem Soc Trans*, **33**, 990-995.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Wiedenmann, A., Benabdelhak, H., Holland, I.B. und Schmitt, L. (2005c) Functional characterization and ATP-induced dimerization of the isolated ABC-domain of the haemolysin B transporter. *Biochemistry*, **44**, 9680-9690.
- Zhang, H., Kurisu, G., Smith, J.L. und Cramer, W.A. (2003) A defined protein-detergent-lipid complex for crystallization of integral membrane proteins: The cytochrome b<sub>6</sub>f complex of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5160-5163.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A. und MacKinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, **414**, 43-48.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

---

|                        |                                                       |
|------------------------|-------------------------------------------------------|
| <i>A. fulgidus</i>     | <i>Archaeoglobus fulgidus</i>                         |
| ABC                    | ATP-binding cassette                                  |
| ATP                    | Adenosin-5'-triphosphat                               |
| <i>B. subtilis</i>     | <i>Bacillus subtilis</i>                              |
| CFTR                   | „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ |
| cmc                    | „critical micelle concentration“                      |
| EhuB                   | ectoine-hydroxyectoine uptake protein B               |
| <i>E. coli</i>         | <i>Escherichia coli</i>                               |
| <i>H. sapiens</i>      | <i>Homo sapiens</i>                                   |
| IMAC                   | immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie  |
| <i>L. lactis</i>       | <i>Lactococcus lactis</i>                             |
| kDa                    | kilo Dalton                                           |
| LmrA                   | lactococcal multidrug resistance protein A            |
| <i>M. jannaschii</i>   | <i>Methanococcus jannaschii</i>                       |
| <i>M. musculus</i>     | <i>Mus musculus</i>                                   |
| MAD                    | „multiple wavelength anomalous dispersion“            |
| MDR                    | „multidrug resistance“                                |
| MIR                    | „multiple isomorphous replacement“                    |
| MR                     | „molecular replacement“                               |
| NBD                    | Nukleotid-bindende Domäne                             |
| PAGE                   | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                       |
| P-gp                   | P-Glykoprotein                                        |
| rmsd                   | „root mean square deviation“                          |
| <i>S. meliloti</i>     | <i>Sinorhizobium meliloti</i>                         |
| <i>S. pneumoniae</i>   | <i>Streptococcus pneumoniae</i>                       |
| <i>S. solfataricus</i> | <i>Sulfolobus solfataricus</i>                        |
| <i>S. typhimurium</i>  | <i>Salmonella typhimurium</i>                         |
| SUR1                   | „sulfonyleurea receptor 1“                            |
| <i>T. litoralis</i>    | <i>Thermococcus litoralis</i>                         |
| TMD                    | Transmembrandomäne                                    |
| <i>V. cholera</i>      | <i>Vibrio cholera</i>                                 |
| % (v/v)                | Volumenprozente                                       |
| % (w/v)                | Gewichtsprozente                                      |

---

## Veröffentlichungen

**Hanekop, N.**, Zaitseva, J., Jenewein, S., Holland, I.B. und Schmitt, L. (2006) Molecular insights into the mechanism of ATP-hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB. *FEBS Lett*, **580**, 1036-1041.

**Hanekop, N.**, Höing, M., Sohn-Bösser, L., Jebbar, M., Schmitt, L. und Bremer, E.  
Crystal structure of the ligand-binding protein EhuB from *Sinorhizobium meliloti* reveals substrate recognition of the compatible solutes ectoine and hydroxyectoine.  
Manuskript in Vorbereitung

## Postervorträge

**Hanekop, N.**, van den Berg van Saparoea, B., Driessen, A. und Schmitt, L. (2005) The rocky road towards crystals of the multidrug-resistance efflux pump LmrA.  
Gordon Research Conference "Mechanisms of Membrane Transport", Tilton, USA

**Hanekop, N.**, Klemm, R., Kuchler, K., Bauer, B. und Schmitt L. (2003) Characterisation of the ATPase activity of purified Pdr5p in detergent solution.  
4th FEBS Advanced Lecture Course „ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Genetic Disease to Multidrug Resistance“, Gosau, Österreich

## Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Robert Tampé für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Möglichkeit diese am Institut für Biochemie anfertigen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem „Co-Doktorvater“ Prof. Dr. Lutz Schmitt. Seine wissenschaftliche Expertise und vor allem seine aussergewöhnliche Fähigkeit zu begeistern und zu motivieren hat entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Bei unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Arnold J. M. Driessen, Prof. Dr. Wil N. Konings, H. Bart van den Berg van Saparoea und Dr. Piotr S. Mazurkiewicz sowie Prof. Dr. Erhard Bremer, Linda Sohn-Bösser und Marina Höing möchte ich mich für die fruchtbare und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Dr. Ulrich Ermler und Sander Smits danke ich für die zahlreichen Diskussionen, die hilfreichen Ratschläge und die Unterstützung bei der Datenaufnahme.

Danken möchte ich weiterhin den Betreuern der BW6 der Max-Planck-Gruppen für Strukturelle Molekularbiologie am Deutschen Elektronen Synchrotron, insbesondere Dr. Gleb Bourenkov, für die hervorragende Unterstützung bei der Aufnahme und Auswertung von Röntgenbeugungsdaten.

Bei Simone Berneiser, Dr. Jörg Hauf, Svenja Hempel, Dr. Peter Kötter und Peter Watzinger bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Fermentation.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie für die kreative Atmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft bedanken, mein besonderer Dank gilt dabei Robert Ernst, Carsten Horn, Stefan Jenewein, Thorsten Jumpertz, Christine Oswald und Jelena Zaitseva.

Last, but not least möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meiner Familie und besonders bei meiner Freundin Anette, für die fortwährende Unterstützung bedanken, die mich ständig von neuem motiviert hat.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Nils Hanekop  
Geburtsdatum: 10. Februar 1976  
Geburtsort: Göttingen



### Hochschulausbildung

seit 06.2001 Promotion am Institut für Biochemie der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. R. Tampé und Prof. Dr. L. Schmitt mit dem Titel:  
„Strukturbiologische Charakterisierung des ABC-Transporters LmrA aus *L. lactis* und des Substratbindeproteins EhuB aus *S. meliloti*“

05.2001 Diplom-Biochemiker-Hauptprüfung mit den Nebenfächern Pharmakologie und Mikrobiologie

10.2000 – 05.2001 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik unter Leitung von Prof. Dr. H. Michel und Dr. C. Hunte mit dem Titel:  
„Phospholipidbindung im Cytochrom bc<sub>1</sub>-Komplex“

10.1996 – 10.2000 Studium der Biochemie an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main

### Schulbildung und Zivildienst

1995 – 1996 Zivildienst am evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende

1995 Abitur am Felix-Klein-Gymnasium in Göttingen

1982 – 1995 Schulbildung in Göttingen

Akademische Lehrer: E. Bamberg, J. Bereiter-Hahn, C. Hunte, E. Egert, K.-D. Entian, H. Fasold, J. Feierabend, K. Fendler, U. Gerhardt, C. Griesinger, U. Günther, B. Kolbesen, A. Kröger, G. Lambrecht, B. Ludwig, H. Michel, W. Müller, R. Prinzing, H. Rüterjans, L. Schmitt, J. Soppa, H. Steiger, R. Tampé, C. Winter, H. Zimmermann